

Wolfgang Bünninger

1959



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554419_0088

Aus dem Hygiene-Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Professor Dr. Heinrich Kliewe)

ZUR BEEINFLUSSUNG
EXPERIMENTELLER VIRUSINFEKTIONEN
DURCH CORTISON

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

vorgelegt von
WOLFGANG BÜNNAGEL
aus Flonheim

1959



Dekan: Professor Dr. Leicher

Referent: Dozent Dr. von Wasielewski

Korreferent: Professor Dr. Kliewe

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.1959

Datum des Diploms: 11. NOV. 1959

Die Auslösung und der Verlauf einer Infektionskrankheit werden allein durch zwei Faktoren bestimmt: einerseits von den biologischen Eigenschaften des infektiösen Agens und andererseits von der Reaktionslage des befallenen Organismus. Diese beiden Faktoren waren in den letzten Jahren Gegenstand zahlreicher experimenteller und klinischer Arbeiten. Besonders die Untersuchung der Reaktionslage des Organismus hat in Forschung und Klinik mehr und mehr an Bedeutung gewonnen, seitdem gezeigt worden ist, daß man zur Erklärung eines Krankheitsablaufs nicht allein mit der Erforschung des Erregers und seiner biologischen Eigenschaften (Pathogenität, Infektiosität und Virulenz (42)) auskommt, sondern daß ein wesentlicher Teil des Krankheitsgeschehens von der Ausgangslage des Organismus abhängt.

Durch die Fortschritte in der Synthetisierung von Hormonen hat die Erforschung der hormonalen Regulation der körpereigenen Abwehr gerade in den letzten Jahren einen großen Aufschwung erfahren. Es sind zahlreiche Arbeiten auf diesem Gebiete erschienen; sowohl die klinische als auch die experimentelle Forschung haben versucht, durch Versuchsreihen und Beobachtungen diesen außerordentlich komplexen Stoff abzuklären. Wie eine sehr sorgfältige und umfassende Arbeit von MELNOTTE, HERBEUVAL und DEBRY (48) zeigt, ist diese Abklärung bis heute keineswegs gelungen. Im Gegenteil, es erscheinen gerade in letzter Zeit beträchtliche Widersprüche zwischen den Ergebnissen der experimentellen und klinischen Forschung: Wo man im Tierversuch eine statistisch gesicherte Wirkung eines Hormons auf die Abwehrlage des Organismus gegen eine bestimmte Infektion feststellen konnte, war diese Wirkung bei derselben Infektion in klinischer Sicht nicht zu bestätigen; oder klinisch festgestellte Hormoneinflüsse konnten experimentell nicht gesichert werden.

Es würde den Rahmen dieser Arbeit weit übersteigen, wollte man im einzelnen auf die Vielzahl der Arbeiten der letzten Jahre eingehen. Es kann deshalb im folgenden nur ein kurzer Abriß der wichtigsten Erkenntnisse auf dem Gebiete der hormonalen Regulation im Bezug zur Infektionslehre gegeben werden:

Insulin: Die Meinung, daß Diabetiker gegen Infektionskrankheiten, insbesondere gegen Staphylokokkeninfektionen der Haut und gegen Tuberkulose, besonders anfällig sind, gehört zum klassischen Allgemeinwissen der Medizin. In der Tat konnten auch FIORU und GARRONF (zit. 48) experimentell bestätigen, daß Kaninchen mit Alloxandibetes gegen Staphylokokkentoxin weniger Resistenz zeigten als Kontrolltiere. Sie bekamen schwerere Hautläsionen, die langsamer heilten. Die Autoren führen dies jedoch auf eine schlechte periphere Sauerstoffversorgung sowie auf die beim Alloxandibetes stets vorhandene

starke Lipaemie und Ketonaemie (10, 11, 12) zurück. Sie verneinten eine Insulinmangelwirkung, zumal sie zeigen konnten, daß Ratten mit Alloxan-diabetes gegenüber intravenösen Gaben von Staphylokokken verschiedener Virulenz deutlich resistenter waren als die Kontrolltiere.

Auch die klinisch gesicherte höhere Empfänglichkeit der Diabetiker für Tuberkulose (48) konnte am Beispiel des Alloxandiabetes nicht bestätigt werden. Dies liegt wahrscheinlich auch daran, daß der Alloxandiabetes mit dem menschlichen Diabetes letztlich nicht vergleichbar ist.

Schilddrüsenhormon: Thyroxin ist ein pro-inflammatorisches Hormon: es vergrößert das Exsudatvolumen, fördert die Bildung von Granulations- und Narbengewebe und begünstigt dadurch die lokale Abwehr. Es verursacht bei akuten Infektionskrankheiten einen deutlichen Temperaturabfall und fördert die Antikörperbildung (48).

Es erschienen wenige Arbeiten, die im einzelnen auf die Wirkung des Thyroxin eingehen:

Nach SELYE (53) sollen sowohl Hypothyreotiker wie Hyperthyreotiker sehr empfänglich für Tuberkulose sein. Beide Behauptungen werden durch experimentelle Untersuchungen gestützt: Einerseits sah MALINSKI (zit. 48) nach Thyroxingabe weniger Lungenherde bei der experimentellen Mäusetuberkulose und erreichte durch Methylthiourazil den entgegengesetzten Effekt. Andererseits konnten MELNOTTE und Mitarbeiter (48) durch tägliche Gaben von 1/10 mg Thyroxin einen schwereren Verlauf der Tuberkulose beim Meer-schweinchen erzielen.

HOLTMAN (zit. 48) verlängerte die Inkubationszeit der Poliomyelitis bei der Maus durch Injektionen von Thyreoidextrakt, während er durch Gaben von Methylthiourazil das raschere Auftreten von Lähmungen und eine deutlich verkürzte Überlebenszeit erreichte.

Sexualhormone: Testosteron verursacht eine Verstärkung der interfibrillären Substanz des Bindegewebes und eine stärkere Fibrillenquellung. Es hemmt die Bildung von Granulationsgewebe. In kleinen Dosen verstärkt es die Antikörperbildung, in großen Dosen hemmt es sie. Sein Wirkungsmechanismus ist wenig bekannt (48). Progesteron scheint antiphlogistisch zu sein. In starken Dosen hemmt es die Antikörperbildung, in kleinen Dosen fördert es sie (48).

Oestrogen soll bei intrakutaner Infektion das Angehen der Tuberkulose verhindern, indem es das Ausbreitungsvermögen der Keime hemmt. Es soll au-

Berdem in hohen Dosen die Antikörperbildung hemmen, während es sie in kleinen Dosen fördern soll (48).

Es wurden wenig Einzelheiten über den Einfluß der Sexualhormone auf den Infektionsablauf berichtet: KLEWE und FISCHER (41) fanden schon 1926 Einflüsse der Kastration auf das Infektionsgeschehen und die Antikörperbildung beim Tier.

KALTER und Mitarbeiter (28) fanden eine verstärkte Influenza-Virus-Multiplikation durch Injektionen von Testosteron, während TEODORU und SHWARTZMAN (58) beim Hamster einen geringen Schutzeffekt bei der Poliomyelitisinfektion feststellen konnten. SHWARTZMAN (54) konnte bei Mäusen durch Testosterongaben keine Änderung im Verlauf der Poliomyelitisinfektion bewirken. SPRUNT und Mitarbeiter (56) erreichten bei Mäusen durch Oestrogenapplikation eine erhöhte Resistenz gegen Vacciniainfektionen.

Hypophysen - Nebennierenrindensystem: Von ungleich größerer Bedeutung als die vorgenannten Organe sind Hypophyse und Nebennierenrinde. Daher beschäftigen sich weitaus die meisten Arbeiten mit diesen Organen und ihrer Beziehung zur Infektionslehre. MELNOTTE und Mitarbeiter (48) kamen sogar zu dem Schluß, daß nach dem heutigen Stand der Wissenschaft allein die Wirkung dieser beiden Organe auf die Reaktionslage des Organismus eine eingehendere Erforschung rechtfertigt.

Unter den zahlreichen Hormonen der Hypophyse hat das ACTH den stärksten Einfluß auf das Infektionsgeschehen. Es ist mit dem Cortison das wichtigste Hormon in diesem Zusammenhang:

Cortison und ACTH erleichtern das Angehen der meisten Infektionen, indem sie die Reaktionsfähigkeit des Organismus gegen die eindringenden Keime schwächen. Sie vermindern die Zahl der Keime im Organismus nicht, sondern scheinen im Gegenteil deren Vermehrung zu begünstigen. Sie unterdrücken die Diapedese und die Beweglichkeit der Phagozyten (s. auch 3, 4, 5) sowie deren Vermögen, Fremdkörper zu zerstören; sie vermindern dagegen nicht deren Absorptionsfähigkeit. Die Regenerationsfähigkeit der Phagozyten wird inhibiert, vermutlich durch die Mitosehemmung des Cortisons (48). (Von anderer Seite (47) wurde jedoch für die weiße Maus eine Erhöhung der Phagozytenaktivität beschrieben.) Durch die beiden Hormone wird eine Infektion entweder lokalisiert oder disseminiert; lokalisiert wird sie durch die Hemmung der Phagozytenwanderung, disseminiert wird sie durch die Hemmung der destruktiven zytoplasmatischen Eigenschaften der Phagozyten. Im letzteren Fall bedeutet der Einbruch der Phagozyten in den Kreislauf die Verschleppung lebender Keime über den ganzen Organismus.

Im folgenden soll ein kurzer Überblick über die bisherigen Ergebnisse klinischer und experimenteller Erforschung der Wirkung der beiden Hormone auf verschiedene Infektionskrankheiten gegeben werden. Auffallend ist auch hier, daß eine gewisse Diskrepanz zwischen den einzelnen Arbeiten besteht, möglicherweise daherrührend, daß die einzelnen Autoren nicht unter den gleichen Kriterien untersucht haben.

a) ACTH

ACTH hat keine Wirkung bei:

klinisch: Poliomyelitis und Pocken,

experimentell: Pferdeencephalitis, Herpes, Tollwut und Poliomyelitis.

ACTH hat keine Schutzwirkung bei:

klinisch: Brucellose, Keuchhustenencephalitis, Grippeencephalitis, Lepra, Pneumokokkeninfektion, Scharlach, Pfeiffer, Mumpsorchitis und Viruspneumonie.

experimentell: S.typhimurium-Infektion

klinisch und experimentell: Cholera

ACTH hat eine verschlimmernde Wirkung bei:

klinisch und experimentell: Brucellose, Pneumokokken-, Streptokokken- und Staphylokokkeninfektion sowie Infektion mit Coxsackie-, Influenza-, Vaccinia- und anderen Virusarten. In hohen Dosen verschlimmert es die Tuberkulose. Seine klinische Wirkung wird bei der Virushepatitis und bei Masern diskutiert (48).

b) Cortison

Die Wirkung des Cortisons hängt von drei Faktoren ab:

1. von Injektionszeitpunkt im Bezug zur Infektion,
2. von der Tierart,
3. von der Art des infektiösen Agens, indem Cortison ohne Wirkung auf Exotoxine ist, jedoch die Resistenz gegen Endotoxine schwächt (48).

Unter Berücksichtigung dieser Faktoren hat Cortison folgende Wirkung:

aa) bei bakteriellen Infektionen:

Cortison hat keine Wirkung bei:

klinisch: Keuchhusten, Diphtherie, Pyocyaneus- und Streptokokkeninfektion,

experimentell: Diphtherie, Streptokokkeninfektion und Tetanus.

Cortison hat eine Schutzwirkung bei:

klinisch: Cholera und Typhusintoxikation, schwerer Brucellose und Coliinfektion sowie bei Lepra, Gonorrhoe, Pneumokokken- und Staphylokokkeninfektion.

experimentell: Infektion mit *S. typhimurium*.

Cortison hat eine verschlimmernde Wirkung bei:

klinisch: Enterokokken- sowie Pertussisinfektionen, es steigert die Empfänglichkeit für Tuberkulose und verschlimmert ihren Verlauf.

experimentell: Brucellose, Pneumokokken- und Staphylokokkeninfektionen sowie in hohen Dosen die Infektion mit *S. typhimurium* (48).

bb) bei Virusinfektionen:

Cortison hat eine Schutzwirkung bei:

klinisch: Masern- und Varizellenencephalitis, infektiöse Mononukleose, Mumpsorchieitis sowie gegen das GUILLAIN-BARRÉsche Syndrom.

experimentell: Herpes.

Cortison hat eine verschlimmernde Wirkung bei: Coxsackie, Bunyamvera, Eiheus, Nil West, Influenza, Poliomyelitis, Vaccinia, Varizellen, EMC, Viruspneumonie.

Seine Wirkung wird in der Klinik diskutiert bei Virushepatitis (48).

Cortison und Virusinfektionen:

Im Gegensatz zu Bakterien, die von sich aus im Gewebe des Wirts vermehrungsfähig sind, ist ein Virus zu seiner Vermehrung ganz und ausschließlich auf den Stoffwechsel der lebenden Zelle angewiesen. Um überhaupt vermehrt werden zu können, muß es also zunächst in die Wirtszelle eindringen (6). Dieser Vorgang der Zellinfektion beginnt mit der Anlagerung des Virus an die Zelloberfläche (6, 19). Die Substanz, welche es an der Zelle festhält, nennt man den Rezeptor (6). Bei Untersuchungen an Phagen hat man festgestellt, daß die Bindung an den Rezeptor durch die proteinhaltige Hüllsubstanz der Phagen hervorgerufen wird (6). Diese Hülle bleibt im weiteren Verlauf der Infektion außen an der Zellmembran kleben, und nur der stark nucleinsäurehaltige Inhalt der Phagen tritt in die Zelle ein, um dort die anschließende Virusvermehrung anzuregen. Ähnliches muß man auch für die meisten tierpathogenen Viren annehmen (6). Kurz nach dem Eindringen in die Zelle zerfallen die Viruspartikel. Sie verlieren ihre Infektiosität und entziehen sich in den meisten Fällen überhaupt dem Nachweis. Sodann werden die Stoffwechselleistungen der Zelle grundlegend geändert. Biochemische Untersuchungen lassen es wahrscheinlich werden, daß eine gemeinsame Ursache für den obligatorisch intrazeellulären Parasitismus der Viren darin zu suchen ist, daß sie

kein Stoffwechselsystem besitzen (9). Das Virus bedient sich also zur identischen Reduplikation der Ausrüstung der lebenden Zelle, und zwar ihrer Proteinsynthese.

Man kann die normalen Eiweißbildungsprozesse einer Zelle in zwei Gruppen aufteilen:

1. In die Vermehrung des Geneiweißes. Dieser Prozeß läuft im Chromonema ab. Man vermutet, daß die einzelnen Bausteine untereinander zu einer Genomkette verknüpft werden, wobei die Information vom Vorhandensein und der Struktur der jeweiligen Desoxyribonucleinsäure ausgeht (9).
2. In die Vermehrung des Cytoplasma. Dieses soll primär von den Genen des Genoms induziert werden, indem spezielle Teile von ihnen Substanzen von Eiweißcharakter produzieren, die zu den Nucleolen gesammelt werden. In diesem Zusammenhang soll eine rasche Synthese von Ribonucleinsäure an der Kernmembran stattfinden, und die Cytoplasmaweißmassen sollen stark zunehmen (9).

Das Prinzip, daß eine Nucleinsäurekomponente für den Ablauf der Eiweißsynthese notwendig ist (6, 9, 19), müßte auch auf die Viren anwendbar sein. Es wäre zu erwarten, daß die einfachsten Virusarten, welche nur eine einzige Eiweißgruppe haben, im Zusammenhang mit ihrer Multiplikation eine Nucleinsäuregruppe von Ribosetyp aufweisen, während höhere Virusarten mit mehreren Eiweißgruppen (Gencharakter!) eine Nucleinsäuregruppe von Desoxyribosetyp besitzen. Sicher ist jedenfalls, daß schon die primitivsten Virustypen die Voraussetzung für den Prozeß der Vermehrung lebenden Materials besitzen, nämlich einen speziellen Eiweißkörper und eine Ribonucleinsäuregruppe. Sie haben also etwas, was man als einen Eiweißreproduktionsapparat bezeichnen könnte (9).

In den frühesten Stadien der Zellinfektion findet eine vorübergehende Vermehrung des Energieumsatzes statt (9), in deren Zusammenhang die Vermehrung der Cytoplasmaweißmassen steht. Die Nucleoli nehmen an Volumen zu, ebenso die Cytoplasmannucleotide. Sowohl die Atmungs Zunahme als auch die Vergrößerung der Nucleolarsubstanz ereignen sich in relativ frühen Stadien der Virusinfektion. Es kann also angenommen werden, daß das Stoffwechselsystem der Wirtszelle schon zu Beginn der Zellinfektion in Gang gesetzt wird, um für die Bildung von virusspezifischen Eiweißkörpern und Nucleinsäuren Verwendung zu finden. Die dazu nötigen Energien stammen aus den oxydativen Phosphorylierungsaktivitäten der Zellen (6, 9, 31).

Ist die Zellinfektion zustande gekommen, so kann man mit drei Ausgängen rechnen: 1. Die Zelle platzt und entleert die infektiösen Viruspartikel. 2. Das Virus wird als Einschlußkörperchen fixiert. 3. Die Zelle wird mit- samt dem Virus vernichtet. (Letzteres ist Grund für die Tatsache, daß viele Viruserkrankungen unter Umständen erst dann klinisch Symptome machen, wenn die Virusvermehrung in den Organzellen ihren Höhepunkt schon überschritten hat, die Viraemie abklingt und die Virusausscheidung ihrem Ende zugeht (6, 9, 49)).

Durch die enge Verknüpfung der Virusvermehrung mit der Zelle und ihrem Stoffwechsel wird auch das pathologisch-anatomische Geschehen im Organismus bestimmt. Während bei der bakteriellen Infektion der Verlauf von der Einwirkung von Toxinen auf das Gewebe beherrscht wird, die nicht nur am Vermehrungsort in Erscheinung treten, so beruht die pathogene Wirkung der Viren auf ihrer Vermehrung in der Zelle. In den einzelnen Phasen der Infektion - Adsorption, Einwanderung, Latenz und schließlich die Bildung neuer Viruselemente - reagiert die Zelle durch ganz bestimmte Änderungen ihrer Stoffwechselvorgänge und damit ihrer morphologischen Struktur an Cytoplasma und Kern (49). Die auftretenden Störungen führen nach einer anfänglichen Stimulierung des Zellstoffwechsels zu einem Abbau und Untergang der Zelle, und damit zu Gewebsänderungen, die von dem intrazellulären Vermehrungsprozeß nicht zu trennen sind (49).

In ihrer Gesamtheit stellen die pathologischen Veränderungen im Organismus alle möglichen Abwandlungen proliferativer und degenerativer Prozesse dar, die nach Art, Ausdehnung und zeitlicher Aufeinanderfolge variieren. Es kommt also zu einer Hyperplasie allein, zu einer Hyperplasie mit Nekrose oder zu einer Nekrose allein. Der Zerstörung folgen erst sekundär Entzündungserscheinungen im benachbarten Gewebe (49).

Kann nun Cortison in diesen Prozeß der Virusvermehrung aktiv eingreifen? Betrachten wir zunächst die Wirkung des Cortisons auf den Zellstoffwechsel:

Cortison wirkt ausgesprochen anti-anabolisch, d. h. es hemmt zwar den Proteinaufbau, führt jedoch andererseits zu einem intensivierten Proteinstoffwechsel mit negativer Stickstoffbilanz (15).

KARNOFSKY (28) stellte durch Untersuchungen am Eintagsküken fest, daß durch Cortison das Wachstum der Tiere erheblich gehemmt wird. Diese

Tatsache konnte von EVANS (13) am 6 Tage lang bebrüteten Hühnerei bestätigt werden. Er fand, daß durch tägliche Injektionen von 1 mg Cortison das Wachstum der Embryonen erheblich verlangsamt wurde. In unserem Labor wurden in diesem Zusammenhang ebenfalls Versuche am Brutei durchgeführt (59), die jedoch aus technischen Gründen bisher nicht beendet werden konnten: 10 Tage lang bebrütete Hühnereier erhielten eine einmalige Injektion von 7,5 mg Cortison in den Dottersack. Nach einer weiteren Bebrütungszeit von 2,4 und 6 Tagen wurden die Eier geöffnet, die Embryonen freipräpariert und naß gewogen. Anschließend wurde für die Embryonen eine Phosphorbilanz aufgestellt. Die anfänglichen Ergebnisse sagen bisher lediglich aus, daß die cortisonbehandelten Embryonen 5-35% leichter waren als die Kontrollen.

Wenn ein Hormon derart stark in die Stoffwechselleistungen der Zelle und des gesamten Organismus eingreift, wenn es dazu noch die körpereigene Abwehr beeinflusst, dann kann angenommen werden, daß eine Virusinfektion unter Cortison einen geänderten Verlauf nimmt.

In der Tat haben sich zahlreiche Autoren - besonders im angloamerikanischen Raum - mit diesem Problem beschäftigt. Besonders KILBOURNE und Mitarbeiter, HORSFALL und Mitarbeiter sowie ARONSON und SHWARTZMAN waren es, die den Einfluß von Cortison auf die Dynamik der Virusmultiplikation untersuchten.

In einer Reihe von Arbeiten haben KILBOURNE und Mitarbeiter versucht, den Einfluß von Cortison auf die Multiplikation von Influenzaviren im bebrüteten Hühnerei abzuklären. In ihrer ersten Veröffentlichung (38) auf diesem Gebiet konnten sie feststellen, daß eine einmalige Injektion von Cortison in den Dottersack 30 Minuten bis 48 Stunden vor der Infektion mit Viren (LEE, PR8, Mumps) die Virusendausbeute signifikant erhöhte.

Sie konnten jedoch auch zeigen, daß eine deutliche Abhängigkeit der Virusausbeute vom Zeitpunkt der Cortisongabe besteht (30): Eine Cortisoninjektion in die Allantoishöhle 1 - 20 Stunden nach der Infektion mit Influenzaviren bewirkte eine starke Vermehrung der Virusmultiplikation bei gleichzeitig unveränderter Absterbezeit der Embryonen. Eine Cortisoninjektion 24 - 42 Stunden nach der Infektion verursachte keine Erhöhung der Virusproduktion bei verlängerter Absterbezeit. Die Injektion 18 - 24 Stunden vor der Virusgabe bewirkte eine verkürzte Überlebenszeit der Embryonen.

Des weiteren untersuchten KILBOURNE und TATENO (39) die Wirkung des Cortisons auf den Verlauf der Virusinfektion bei Chorioallantoismembranstückchen in vitro: Gleichgroße Membranstückchen wurden in eine Nährlösung gebracht und mit LEE-Virus infiziert. Die Hälfte der Röhrchen erhielt gleichzeitig mit der Infektion eine einmalige Cortisongabe von 14 Gamma/ml. Alle Röhrchen wurden in einem Warburg-Gerät bei $+35^{\circ}\text{C}$ geschüttelt. Nach verschiedenen Zeitabschnitten wurden Versuchs- und Kontrollröhrchen hämagglutinatorisch auf ihren Virusgehalt untersucht. Es zeigte sich, daß in den ersten Stunden der Bebrütung keine Differenzen im Virusgehalt zu bestimmen waren, daß jedoch gegen Ende der Bebrütungszeit die Cortisongruppen erheblich mehr Virus enthielten als die Kontrollen.

Die Verlängerung der Überlebenszeit erklären die Autoren mit einer maximalen Unterdrückung der entzündlichen Reaktionen in der Chorioallantoismembran. Es wird betont, daß dieser Effekt des Cortisons nur vorübergehend ist. Die Verkürzung der Überlebenszeit, die eintritt, wenn Cortison vor der Infektion gegeben wird, könne damit zusammenhängen, daß durch Cortison eine höhere Virussynthese angeregt wird, während das Cortison vor dem Auftreten der Entzündungsreaktion schon abgebaut ist (32).

In einer späteren Arbeit (31) beschäftigt sich KILBOURNE mit dem Problem der Reaktivierung von thermisch inaktiviertem Influenza-Virus: Durch Cortisongaben konnte er erreichen, daß Virussuspensionen, die durch Wärmebehandlung inaktiviert werden, wieder voll an der Multiplikation teilnahmen. Er nahm an, daß das Cortison den Zellstoffwechsel soweit aufrecht hält, daß die teilweise inaktivierten Viruspartikel von der Zelle noch synthetisiert werden können. Damit kommt er zu dem Schluß, daß die inaktivierten, aber reaktivierbaren Viren an den Zellstoffwechsel höhere Anforderungen stellen als voll aktive Viren (s. auch 44), daß sie aber andererseits weniger toxisch sind. Die Reaktivierung der Viren durch Cortison gehe möglicherweise über die Freimachung von endogenen Energiequellen der Zelle (oxydative Phosphorylierung) (6, 9) vonstatten. Oder aber es werde ein neuer, anderer Weg des KH-Stoffwechsels erschlossen, der die Einbeziehung von wenig differenziertem Virus in den Multiplikationsprozeß ermöglicht (31).

1956 beschreibt KILBOURNE (34) erstmals seine Beobachtungen über den zeitlichen Ablauf der Virusmultiplikation mit und ohne Cortison. Er konnte damals bei cortisonbehandelten Bruteiern eine initiale Verzögerung der Influenza-B-Virus-Multiplikation mit nachfolgender starker Erhöhung der Multiplika-

tionsrate bemerken. KILBOURNE verglich nun den Virusgehalt der Allantoisflüssigkeit mit dem der Chorioallantoismembran und kam zu dem Ergebnis, daß anfangs die Viren in den Membranzellen retiniert werden. Diese Erscheinung könne als eine Cortisonwirkung erklärt werden, entweder auf die Zellpermeabilität oder auf die Rezeptoren der Zelle oder auf die Konzentration eines "Virusbindungsinhibitors" in der Membran. Die Wirkung auf die Zellpermeabilität sei am wahrscheinlichsten.

In einer neueren Untersuchung (35) wird der gleiche diphasische Effekt des Cortisons festgestellt, nämlich eine der initialen Hemmung folgende überschießende Virussynthese. In dieser Arbeit werden jedoch alle Änderungen im Absorptions- und Elutionsvermögen der Zelle verneint. Es wird vielmehr allein eine Hemmung der Virussynthese (37) konstatiert, weil die neueren Untersuchungen zu Beginn niedrigere Virustiter sowohl in Membran als auch in der Allantoisflüssigkeit ergeben haben. Der Autor macht für die unter Cortison diphasische Kurve des Virusanstiegs zwei gegensätzliche Wirkungen des Cortisons verantwortlich, nämlich einerseits die Hemmung der Virussynthese und andererseits die Hemmung der Autointerferenz (35, 36, 37).

Die Interferenzhemmung (s. auch 21, 22) durch Cortison wurde am Beispiel des Influenza-B-Virus genauer untersucht: Die Anfangsausbeute ist vermindert, wenn eine hohe Impfdosierung gewählt wird, nämlich mehr als 20 Viruspartikel/Zelle (Zahlenangaben bei 24, 25). Der geringere Effekt des Cortisons auf den initialen Virusanstieg bei niedriger Infektionsdosis sei eine direkte Wirkung auf die Hemmung der Autointerferenz bei starker Synthesehemmung (36).

Von großem Interesse erscheint uns die Tatsache, daß das Cortison schon in kleinsten Dosen wirksam sei (1 Gamma/Ei!) und daß seine Wirkung, ohne toxisch zu sein, zeitlich begrenzt ist. Eine genaue Erklärung der Cortisonwirkung erscheint KILBOURNE noch nicht möglich (36, 37).

FONG und LOUIE (14) untersuchten ebenfalls die Wirkung des Cortisons auf die Interferenz bei Influenza-A-Viren. Als Interfering-Virus (52) verwendeten sie eine Virusaufbereitung, die mit Bis-beta-chloroäthylsulfid inaktiviert worden war. Sie stellten fest, daß durch Cortison die Virus-Endausbeute 7 bis 10 mal gesteigert wurde. Die Cortisondosierung spielte keine Rolle bezüglich der Ausbeute. Auch ihnen gelang keine eindeutige Erklärung der Cortisonwirkung.

Neueste Untersuchungen von ISAACS und LINDENMANN (26, 27, 45) haben gezeigt, daß bei der Reaktion des Virus mit der Zelle ein bislang unbekannter Stoff entsteht, das von ihnen so genannte Interferon. Dieses Interferon wurde von den Autoren gewonnen, indem sie Chlorioallantoismembranen von bebrüteten Hühnereiern mit thermisch inaktiviertem Influenza-A-MEL-Virus beimpften und dann in vitro bebrüteten. Das Interferon unterscheidet sich vom Influenza-Virus schon dadurch, daß es keine hämagglutinierenden Eigenschaften besitzt und durch Antisera nicht neutralisiert wird. Außerdem läßt es sich bei Beschleunigungen, welche die Viren sedimentieren, nicht zur Sedimentation bringen. Es wird jedoch durch Filter mit mittlerem Porendurchmesser von 0,5 bis 1 μ sicher zurückgehalten.

Wir haben Versuchsreihen mit dem Interferon angesetzt (59), um zu prüfen, ob entweder seine Bildung durch Cortison verhindert oder ob es selbst durch Cortison in seiner Wirksamkeit gehemmt wird. Die Gewinnung von Interferon nach der von ISAACS und LINDENMANN angegebenen Methode gelang uns mit Influenza-A-PR8- und Influenza-B-LEE-Stämmen nicht. Eine Serie mit dem Originalstamm der Autoren konnte aus technischen Gründen noch nicht begonnen werden.

Auch tierexperimentell wurde versucht, den Einfluß von Cortison auf die Virusmultiplikation aufzuklären. Es waren besonders KILBOURNE, SHWARTZMAN und TEODORU, die sich mit diesem Problem beschäftigten.

KILBOURNE und DAVES (40) fanden, daß unter Cortison ein nicht mäuseadaptierter Influenza-A-Stamm erheblich früher mäusepathogen wurde als bei Tieren, die kein Cortison erhalten hatten. Es zeigte sich nämlich, daß unter einer Cortisondosis von 3 mal 5 mg pro Maus schon in der 3. Passage Lungenläsionen feststellbar waren, während bei einer Dosierung von 1 mal 5 mg pro Maus die Läsionen erst in der 8., und ohne Cortison erst in der 10. Passage auftraten. Außerdem konnte festgestellt werden, daß unter Cortison bei der Influenza-infizierten Maus die Antikörperbildung unterdrückt wurde (33), jedoch nur dann, wenn Cortison sehr lange und hoch dosiert gegeben wurde (5 mal 3 mg pro Maus) (40). Durch hohe Dosen von Cortison soll die Phagozytose stark beschleunigt werden (0,1 bis 1,0 mg pro Maus, 12 stdl.) (47). ARONSON und SHWARTZMAN (2, 54, 55) sowie TEODORU (57) bemerkten bei der experimentellen Poliomyelitisinfektion - sowohl des Hamsters wie auch der weißen Maus - unter Cortison eine signifikante Erschwerung des Krankheitsbildes, die sich in verkürzter Inkubationszeit, schwererer Symptomatik, verkürzter Über-

lebenszeit und höherer Mortalität manifestierte. Außerdem stellten sie eine starke Erhöhung der Viruskonzentration fest (2). Histologisch wurden stark verminderte intracerebrale Entzündungserscheinungen konstatiert. Jedoch war die Neuronenzerstörung ausgesprochen erhöht, meist beiderseitig und früher im Infektionsverlauf (54, 55). Von POETSCHKE (50) wird eine Arbeit von SHWARTZMAN und FISCHER (55) zitiert, in der von einer Virulenzsteigerung der Viren unter Cortisoneinwirkung berichtet sei. Weder in dieser noch in anderen Arbeiten der genannten Autoren haben wir Hinweise gefunden, die auf eine direkte Wirkung des Cortisons auf die Virulenz der Viren schließen lassen.

Aus dem Gesagten läßt sich also folgendes zusammenfassen:

1. Die Virusmultiplikation ist an die Stoffwechselfunktionen der lebenden Zelle gebunden.
2. Cortison hat einen starken Einfluß auf den Eiweißstoffwechsel der Zelle.
3. Durch die Applikation von Cortison kann der Stoffwechsel der Zelle so beeinflußt werden, daß das Ausmaß der Virusmultiplikation verändert wird.
4. Die Ursachen der Änderung der Virusproduktion unter Cortisoneinfluß sind noch unklar. Es bestehen vorerst die Möglichkeiten:
 - a) des Einflusses auf die Virusinterferenz,
 - b) des Einflusses auf die Virussynthese.
5. Die festgestellten Änderungen des Verlaufs von Virusinfektionen beim Tier unter Cortison können abhängen:
 - a) von der veränderten Virusmenge,
 - b) von der veränderten Virusvirulenz,
 - c) von der veränderten Abwehrlage des infizierten Organismus.
6. Die Wirkung des Cortisons hängt ab von der Art des untersuchten Virus sowie vom Zeitpunkt der Applikation.
7. Die Wirkungsweise des Cortisons ist bislang noch keineswegs geklärt.

METHODIK

Es ging uns in unseren Untersuchungen in der Hauptsache um die Abklärung zweier Fragen:

1. läßt sich durch Cortison die zeitliche Absterbeordnung von Tieren mit Virusinfektion beeinflussen?
2. Bestehen Einflüsse des Cortisons auf die Virusproduktion und welcher Art sind diese?

Versuchsgruppe I

Zur experimentellen Untersuchung der Beeinflussung der zeitlichen Absterbeordnung von Tieren mit Virusinfektionen griffen wir aus den uns zur Verfügung stehenden Viren zwei Stämme heraus:

- a) den Influenza-A-Stamm PR8, ein pneumotropes Virus also, das sowohl pathologisch-anatomisch durch die von ihm verursachten schon makroskopisch erkennbaren Lungenveränderungen als auch hämagglutinatorisch einen leichten Nachweis gestattet; und
- b) ein Virus aus der FMC-Gruppe (Encephalomyocarditis-Gruppe), ein neurotropes Virus, das durch sein markantes Krankheitsbild (s. u., s. auch (1)) nachweisbar ist, sich jedoch weiteren uns zugänglichen Nachweismethoden entzog.

Viren

a) Influenza: Ein mäuseadaptierter Influenza-A-Stamm PR8 wird im Hygiene-Institut Mainz seit längerer Zeit durch Serientierpassagen gehalten. Zur Herstellung des Infektionsmaterials gingen wir folgendermaßen vor: 5 bis 10 frisch an Influenza gestorbenen Mäusen wurde unter sterilen Kautelen die gesamte Lunge herauspräpariert. Diese Lungen wurden anschließend mit steriler physiologischer Kochsalzlösung von anhaftendem Blut gereinigt und in einem sterilen Mörser mit sterilem feinem Quarzsand zerrieben, so lange, bis keine groberen zusammenhängenden Gewebspartien mehr erkennbar waren. In Vorversuchen hatten wir festgestellt, daß eine Mäuselunge mit Influenzapneumonie ziemlich genau 300 mg wiegt (s. auch (1)). Wir setzten folglich dem im Mörser befindlichen Lungenbrei 2,7 ml sterile physiologische Kochsalzlösung pro Lunge zu und erhielten so eine Verdünnung von 1 : 10 als Ausgangssuspension.

sion. Nach sehr kurzem Abzentrifugieren bei einer Drehzahl unter 500 U/min. wurde nach der Zehnerlogarithmusreihe weiterverdünnt.

Die Infektion der Tiere mit Influenza-Virus erfolgte unmittelbar im Anschluß an die Herstellung der Virussuspension und der Verdünnungen: In leichter Aethernarkose wurde den Tieren die Suspension mit feiner Pipette auf die Nasenlöcher getropft, so daß die Tiere inhalieren mußten (Instillation). Jedes Tier bekam 4 Tropfen der jeweiligen Verdünnung. Es liegt in der Natur dieser Methode, daß eine ganz exakte Dosierung - wie beispielsweise bei einer Injektion - nicht zu erreichen ist, zumal gesagt werden muß, daß die Narkosebreite der Maus recht klein ist und bei zu tiefer oder zu flacher Narkose eine gleichmäßige Inhalation nicht gewährleistet ist.

b) EMC: Auch der Encephalomyocarditisstamm wird im Hygiene-Institut Mainz in Serientierpassagen gehalten. Zur Herstellung des Infektionsmaterials wurde 5 bis 10 frisch an EMC gestorbenen Mäusen steril das Gehirn entnommen. Nach kurzem Waschen in steriler physiologischer Kochsalzlösung wurden die Gehirne (die, wie wir ebenfalls in Vorversuchen feststellten, ca. 300 mg wiegen, s. auch (1)) mit je 2,7 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung in einer Schüttelflasche mit Glasperlen ca. 5 bis 10 Minuten kräftig geschüttelt. Wenn keine größeren Gewebspartien mehr erkennbar waren, wurde die Suspension 15 Minuten lang bei 3000 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde als 1 : 10 verdünnte Stammsuspension angesehen und nach der Zehnerlogarithmusreihe weiterverdünnt.

Die Infektion erfolgte im unmittelbaren Anschluß an die Herstellung der Suspensionen, und zwar durch subkutane Injektion von 0,3 ml der gewünschten Verdünnung.

Wenn aus irgendwelchen Gründen die Organe nicht unverzüglich weiterverarbeitet werden konnten, so erfolgte die Aufbewahrung der unversehrten Organe (Lungen und Gehirne) in einem sterilen Gemisch von gleichen Teilen Glycerin und physiologischer Kochsalzlösung bei -20°C in einer Tiefkühltruhe.

Versuchstiere

Sämtliche Versuche wurden mit männlichen weißen Mäusen von 20 g Gewicht durchgeführt. Wir verwendeten deshalb nur männliche Tiere, weil wir even-

tuell auftretende (zyklusbedingte) hormonale Dysregulationen, die den Versuchsablauf stören könnten, vermeiden wollten.

Steroidhormone

Aus der großen Anzahl der Corticosteroide wählten wir zwei Hormone aus, die uns in bezug auf Applikationstechnik und Wirkungsweise besonders günstig erschienen:

a) Prednison: Wir verwendeten ein wasserlösliches Prednisonpräparat (Solu-Decortin "Merck", Spezialeinwaage für Laborversuche, 10 mg/ml). Die Verdünnungen erfolgten mit 0,45%iger Kochsalzlösung, um die Kochsalzbelastung der Tiere möglichst gering zu halten. Die Injektionen erfolgten mit Kanüle Nr. 16 tief intramuskulär. Die Tagesdosis lag pro Tier bei 0,03 bzw. 0,3 mg, das entspricht bei einem mittleren Gewicht der Tiere von 20 g einer Dosierung von 1,5 bzw. 15 mg pro kg. Wir teilten die Tagesdosis wegen der raschen Resorbierbarkeit des Präparats in 2 Einzeldosen von je 0,15 ml Volumen auf. Die Injektionen wurden bis zum Tod der Tiere fortgesetzt. Die erste Injektion erfolgte eine Stunde vor der Infektion.

b) Cortison: Es handelte sich um eine wässrige Suspension von Cortisonacetat (Incortin "Merck", 25 mg/ml, Kristallsuspension). Auch hier erfolgten die Verdünnungen mit 0,45%iger Kochsalzlösung, jedoch erhielten die Tiere nur eine Injektion täglich, da eine wesentlich langsamere Resorption zu erwarten war. Wir injizierten mit Kanüle Nr. 12 tief intramuskulär. Wegen der geringeren Wirksamkeit des Cortisons im Vergleich zum Prednison wählten wir eine höhere Dosierung, nämlich 0,25 mg bzw. 1 mg pro Tier pro Tag, das entspricht einer Dosierung von 12,5 bzw. 50 mg pro kg. Das Volumen der Einzeldosis betrug 0,2 ml.

Die Kontrolltiere erhielten jeweils das gleiche Volumen 0,45%iger Kochsalzlösung, also beim Prednisonversuch 2 mal 0,15 ml und beim Cortisonversuch 1 mal 0,2 ml täglich.

Klinischer Krankheitsverlauf

a) Influenza: Schon nach 3 Tagen zeigten die Tiere deutliche Krankheitszeichen: Die Nahrungsaufnahme war eingeschränkt, die Tiere hatten ein ge-

sträubtes, glanzloses Fell und eine typische zusammengekauerte Haltung (sog. "Kugelmaus") (Abb. s. (1)), die Atmung war beschleunigt. Wenn man das Ohreinem Käfig mit vielen Tieren näherte, konnte man ein deutliches Rasselgeräusch vernehmen, das wohl von Flüssigkeitsansammlungen in den Bronchien und in der Trachea der Tiere herrührte. Je nach Infektionsdosis trat der Tod nach 3 bis 10 Tagen ein. Bei der Sektion zeigten sämtliche Tiere eine schon makroskopisch feststellbare massive Pneumonie fast aller Lungenabschnitte. Zur Kontrolle wurden die Lungen hämagglutinatorisch auf ihren Influenza-Virus-Gehalt untersucht. Außerdem wurden von einzelnen Lungen Tupfpräparate gemacht, nach Giemsa gefärbt und auf GUARNERISCHE Körperchen untersucht (häufige latente Ektromelie-Infektion der weißen Maus) (Abb. s. (1)).

b) EMC: Im Verlauf dieser Infektion standen Hinterbeinlähmungen und encephalitische Symptome im Vordergrund (s. auch (1)): Schon nach 3 Tagen traten die ersten Lähmungen auf, zunächst einseitig, dann doppelseitig. Schließlich wurden die Hinterbeine steif nach hinten gehalten, und die Tiere bewegten sich nur mühsam mit den Vorderbeinen. Die encephalitischen Symptome äußerten sich insbesondere in großer Unruhe, Geräuschempfindlichkeit und Gleichgewichtsstörungen. Besonders letztere waren sehr auffallend: Die Tiere drehten sich oft stundenlang um ihre Längsachse. Der Tod erfolgte meist an einer aufsteigenden Lähmung, jedoch starben manche scheinbar gesunden Tiere ganz plötzlich nach kurzer motorischer Unruhe unter Schnappatmung (Myocarditis?).

Bei beiden Infektionen gelang es nicht, Unterschiede im klinischen Krankheitsablauf bei den corticoidbehandelten Tieren und den Kontrollen festzustellen.

Bestimmung der zeitlichen Absterbeordnung

a) Absterbezeit: Durch fortlaufende Kontrolle wurde die Absterbezeit (s. auch 16, 17, 18) ermittelt. Unter der Absterbezeit versteht man die Zeit von der Infektion bis zum Eintritt des Todes. Sie wurde auf Stunden genau bestimmt. Für die Nachtstunden von 23 Uhr bis 8 Uhr wurde der Mittelwert angenommen.

b) Absterbebeschwindigkeit: Da in manchen Kollektiven einzelne Tiere überlebten und dadurch ihre Absterbezeiten gegen unendlich gingen,

verwendeten wir in unseren Tabellen ausschließlich die Absterbegeschwindigkeiten: Unter dem von PRIGGE (53) eingeführten Begriff der Absterbegeschwindigkeit versteht man den Reziprokwert der Absterbezeit, multipliziert mit 1000. Je höher also die Absterbezeiten sind, um so kleiner werden die Absterbegeschwindigkeiten. Für überlebende Tiere beträgt die Absterbegeschwindigkeit $\frac{1}{\sqrt{\infty}} \cdot 1000 = 0$.

c) Berechnung der Mittelwerte und ihrer Streuung: Für die Berechnung der Mittelwerte und ihrer Streuung bedienten wir uns des STUDENT's Tests in Anlehnung an die in den DOCUMENTA GEIGY (15) beschriebene Methode. Danach ist der Mittelwert einer Stichprobe mit den Einzelwerten $x_1, x_2, x_3, \dots, x_N$ definiert als der Quotient aus der Summe aller Einzelwerte, dividiert durch ihre Gesamtzahl N:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum (x)$$

Die Streuung aller Einzelwerte einer Stichprobe ist definiert als der Quotient aus der Summe aller ins Quadrat erhobenen Einzelwerte, vermindert um das durch die Zahl der Einzelwerte dividierte Quadrat der Summe aller Einzelwerte, dividiert durch die um 1 verminderte Zahl aller Einzelwerte:

$$S^2 = \frac{1}{N-1} \left(\sum (x^2) - \frac{[\sum (x)]^2}{N} \right)$$

Dann ist die Standardabweichung der Einzelwerte einer Stichprobe

$$S = \sqrt{S^2}$$

Die Streuung des Mittelwertes einer Stichprobe ist

$$S_{\bar{x}}^2 = \frac{1}{N} S^2$$

und die Standardabweichung eines Mittelwertes ist

$$S_{\bar{x}} = \frac{1}{\sqrt{N}} S$$

wobei N die Gesamtfrequenz aller Stichprobeneinzelwerte und S^2 die Streuung der Stichprobe ist.

Die Streuung der Mittelwerte ist also um so kleiner, je größer die Zahl der Einzelwerte ist. Größere Stichproben sind deshalb vertrauenswürdiger als kleine, sofern ihre Zusammenstellung mit der gleichen Sorgfalt getroffen wurde.

d) Prüfung der Signifikanz der Differenz zweier Mittelwerte (15): Wir erhalten die Abweichung t, mit der wir in der Tabelle die Wahrscheinlichkeit P suchen, durch Division der Mittelwertsdifferenz ($\bar{x} - \bar{y}$) durch die Standardabweichung S_D der Mittelwertsdifferenz.

Wir berechneten zunächst die gemeinsame Streuung beider Mittelwerte:

$$s_{\bar{x}-\bar{y}} = \frac{s(x^2) - \frac{[s(x)]^2}{N} + s(y^2) - \frac{[s(y)]^2}{N}}{N_x + N_y - 2}$$

Die Standardabweichung der Mittelwertsdifferenz ist dann:

$$s_D = s_{x-y} \sqrt{\frac{N_x + N_y}{N_x \cdot N_y}}$$

und

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{s_D}$$

Als Kriterium für die Signifikanz der Differenz zweier Mittelwerte wählen wir ein P kleiner als 0,05, was einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 95% entspricht, einem Wert also, der für die Beurteilung von biologischen Daten völlig ausreicht.

Versuchsanordnung und Ergebnisse

Größere einheitliche Tierkollektive wurden mit abgestuften Virusmengen infiziert. Eine Stunde vor der Infektion erhielt jeweils die Hälfte der Tiere Prednison bzw. Cortison, während die andere Hälfte der Tiere das gleiche Volumen 0,45%iger Kochsalzlösung erhielt. Wir bestimmten nunmehr die mittleren Absterbegeschwindigkeiten der Tierkollektive, errechneten die jeweilige Standardabweichung der Mittelwerte sowie die Signifikanz der eventuellen Differenz der Mittelwerte und hielten die Ergebnisse tabellarisch fest (s. Tab. 1 bis 3).

Ergebnis

a) Influenza: Wie aus Tabelle 1, S.19 ersichtlich, waren die Absterbegeschwindigkeiten sowohl bei den Tieren, die Cortison erhalten hatten als auch bei den Kontrollen, sehr unterschiedlich. Es waren starke Schwankungen im Infektionsvermögen der Ausgangssuspensionen zu beobachten, obwohl die Versuchsansätze stets gleichartig ausgeführt wurden, und obwohl der Virusstamm stets durch fortlaufende Mäusepassagen geführt wurde (vgl. Absterbegeschwindigkeiten der Kontrollen der Tabelle 1). Es wurde nicht untersucht, ob dies auf Schwankungen in der Zahl der infektiösen Einheiten oder auf Schwan-

Virus	N	Cort. mg/kg	mittlere Absterbe- geschw. $\pm S_{\bar{x}}$	P	N	Cort. mg/kg	mittlere Absterbe- geschw. $\pm S_{\bar{x}}$	P	N	Cort. mg/kg	mittlere Absterbe- geschw. $\pm S_{\bar{x}}$	P
10^{-3}									25	50	$14,9 \pm 0,7$	$>0,8$
									25	$\emptyset$	$14,1 \pm 0,7$	
10^{-4}	15	$12,5$	$13,4 \pm 0,56$	$>0,5$	20	50	$12,2 \pm 0,59$	$<0,02$	25	50	$13,1 \pm 0,8$	$>0,8$
	15	$\emptyset$	$14,2 \pm 1,1$		20	$\emptyset$	$14,4 \pm 0,69$		25	$\emptyset$	$12,9 \pm 0,5$	
10^{-5}	15	$12,5$	$12,1 \pm 0,61$	$<0,02$	20	50	$11,3 \pm 0,53$	$>0,9$	50	$12,5$	$11,2 \pm 0,28$	$>0,8$
	15	$\emptyset$	$10,2 \pm 0,36$		20	$\emptyset$	$11,5 \pm 0,65$		50	$\emptyset$	$11,3 \pm 0,31$	
10^{-6}	15	$12,5$	$10,1 \pm 0,51$	$<0,01$	30	$12,5$	$12,1 \pm 0,53$	$>0,2$	50	$12,5$	$8,0 \pm 0,3$	$<0,05$
	15	$\emptyset$	$9,2 \pm 0,36$		30	$\emptyset$	$11,3 \pm 0,69$		50	$\emptyset$	$7,1 \pm 0,32$	
10^{-7}	15	$12,5$	$6,4 \pm 0,69$	$>0,7$	50	$12,5$	$2,3 \pm 0,38$	$<0,001$	50	$12,5$	$5,5 \pm 0,3$	$<0,001$
	15	$\emptyset$	$6,2 \pm 0,41$		50	$\emptyset$	$0,9 \pm 0,25$		50	$\emptyset$	$3,3 \pm 0,38$	
10^{-8}					50	$12,5$	$4,1 \pm 0,19$	$<0,001$	50	$12,5$	$2,6 \pm 0,3$	$>0,2$
					50	$\emptyset$	$0,7 \pm 0,22$		50	$\emptyset$	$3,3 \pm 0,4$	

Tabelle 1: Zeitliche Absterbeordnung der Tiere mit Influenza-A-Infektion unter Cortison.

Virus	N	Cort. mg/kg	mittlere Absterbe- geschw. $\pm S_{\bar{x}}$	P	N	Cort. mg/kg	mittlere Absterbe- geschw. $\pm S_{\bar{x}}$	P
10^{-5}	25 25	50 ø	$12,8 \pm 0,44$ $11,8 \pm 0,46$	$>0,1$	15 15	12,5 ø	$11,2 \pm 0,53$ $9,8 \pm 0,49$	$>0,05$
10^{-6}	25 25	50 ø	$12,3 \pm 0,48$ $8,5 \pm 0,48$	$<0,001$	15 15	12,5 ø	$10,7 \pm 0,56$ $8,6 \pm 0,54$	$<0,01$
10^{-7}	25 25	50 ø	$10,4 \pm 0,8$ $5,5 \pm 0,92$	$<0,001$	15 15	12,5 ø	$8,5 \pm 0,67$ $3,7 \pm 1,1$	$<0,001$
10^{-8}	25 25	50 ø	$6,1 \pm 0,42$ $3,5 \pm 0,73$	$<0,01$	15 15	12,5 ø	$2,8 \pm 0,77$ $1,7 \pm 0,9$	$>0,3$

Tabelle 2: Zeitliche Absterbeordnung der Tiere mit EMC-Infektion unter Cortison.

Virus	N	Predn. mg/kg	mittlere Absterbe- geschw. $\pm S_{\bar{x}}$	P	N	Predn. mg/kg	mittlere Absterbe- geschw. $\pm S_{\bar{x}}$	P
10^{-4}	50 50	1,5 $\emptyset$	10,9 $\pm$ 0,49 9,2 $\pm$ 0,59	<0,05	50 50	15 $\emptyset$	12,9 $\pm$ 0,44 12,4 $\pm$ 0,37	>0,8
10^{-5}								
10^{-6}								
10^{-7}					25 25	15 $\emptyset$	9,3 $\pm$ 0,92 5,5 $\pm$ 0,92	<0,01
10^{-8}					25 25	15 $\emptyset$	0,4 $\pm$ 0,3 3,5 $\pm$ 0,72	<0,001

Tabelle 3: Zeitliche Absterbeordnung der Tiere mit EMC-Infektion unter Prednison.

kungen im Virulenzverhalten der infektiösen Einheiten zurückzuführen ist. Auch die Differenzen zwischen der Absterbegeschwindigkeit der Cortisonkollektive und der Kontrollen waren in den einzelnen Versuchsansätzen sehr unterschiedlich: Bei einer Verdünnung der Infektionssuspension von 1 : 1000 lag die mittlere Absterbegeschwindigkeit der Cortisontiere mit $14,9 \pm 0,7$ zwar über der der Kontrollen ($14,1 \pm 0,72$), jedoch ließ sich keine Signifikanz errechnen ($P > 0,8$). Bei einer Verdünnung der Infektionssuspension von 1 : 10 000 lag in einem Versuchsansatz die mittlere Absterbegeschwindigkeit der Cortisontiere über der der Kontrollen, jedoch bei zwei weiteren Ansätzen übertrafen die mittleren Absterbegeschwindigkeiten der Kontrollen deutlich die der Cortisontiere. Auch bei der Verdünnung 1 : 100 000 der Infektionssuspension übertrafen in zwei Versuchsansätzen die mittleren Absterbegeschwindigkeiten der Kontrollen die der Cortisongruppen, und nur in einem Versuch war die mittlere Absterbegeschwindigkeit der Cortisontiere größer als die der Kontrollen. Erst bei Verdünnungen der Infektionssuspension über 1 : 1 000 000 wird das Bild einheitlicher. Hier lagen die mittleren Absterbegeschwindigkeiten der Cortisontiere deutlich und größtenteils signifikant über denen der Kontrollkollektive.

b) EMC: Bei unseren Versuchen mit EMC-Infektionen konnten wir ähnliche Befunde erheben wie bei der Influenza-Infektion (s. Tab. 2 und 3, S. 20 u. 21). Auch hier lagen bei den niedrigen Verdünnungen der Infektionssuspension die mittleren Absterbegeschwindigkeiten der Cortison- und Prednisontiere höher als die der Kontrollen, jedoch ließ sich auch hier keine Signifikanz errechnen. Erst bei Verdünnungen über 1 : 1 000 000 hatten die Cortisontiere eine signifikant höhere mittlere Absterbegeschwindigkeit als die Kontrollen.

Erklärung zu den Tabellen 1 bis 3:

-
- Virus = bei Influenza: 4 Tropfen der angegebenen Verdünnung.
bei EMC: 0,3 ml der angegebenen Verdünnung.
- N = Anzahl der Tiere pro Kollektiv.
- Cortison = tägliche Injektion der angegebenen Gewichtsmenge in 0,2 ml Volumen.
- Prednison = zweimalige tägliche Injektionen der angegebenen Gewichtsmenge in je 0,3 ml Volumen.
- P = Wahrscheinlichkeit.

Bei den höchsten Verdünnungen (1 : 100 000 000) der Infektionssuspension erlebten wir allerdings eine Überraschung insofern, als zwar nach Cortisongabe die mittlere Absterbegeschwindigkeit der Versuchstiere signifikant erhöht war, jedoch nach Prednisongabe signifikant erniedrigt war.

Zusammenfassend läßt sich also sagen:

1. Wir konnten in unserer ersten Versuchsgruppe zeigen, daß die zeitliche Absterbeordnung von Tieren mit Virusinfektionen durch Corticoide beeinflußt wird.
2. Diese Corticoidwirkung hängt jedoch bei beiden untersuchten Virusstämmen deutlich von der Infektionsdosis ab: Bei hohen Virusdosen waren die mittleren Absterbegeschwindigkeiten nicht sicher verschoben, während bei niedriger Virusdosierung eine signifikante Erhöhung der mittleren Absterbegeschwindigkeiten derjenigen Tiere, die Corticoide erhalten hatten, zu konstatieren war.
3. Unterschiede in der Wirksamkeit der beiden geprüften Corticoide konnten wir nicht feststellen.
4. Ebenso konnten wir bei den von uns gewählten Konzentrationen keine Einflüsse der Höhe der Corticoiddosis bemerken.

Versuchsgruppe II

Nachdem wir in unserer ersten Versuchsgruppe eine signifikante Wirkung der Corticoidmedikation auf die zeitliche Absterbeordnung von Tieren mit Virusinfektionen festgestellt hatten, lag die Frage nach der Ursache dieser Wirkung nahe. Handelt es sich bei diesem Phänomen um eine Wirkung auf die Viren selbst oder beruht die Verschiebung der Absterbegeschwindigkeiten lediglich auf einer veränderten Resistenzlage der Versuchstiere? Wir versuchten also in unserer zweiten Gruppe von Experimenten, folgende Fragen zu klären:

1. Läßt sich im Versuchstier durch Cortisongaben die im Verlauf einer Virusinfektion auftretende Virusmenge verändern?
2. An welchem Punkt der Virusvermehrung greift das Cortison an?
 - a) Virussynthese?
 - b) Virusinterferenz?

Es war also zunächst nötig, einen quantitativen Nachweis der Viren in den

Organen der Tiere zu führen. Wir wählten dazu zwei Wege: a) die Bestimmung des Infektionstiters und b) den hämagglutinatorischen Nachweis.

a) Infektionstiter: Wir wählten die Methode der Bestimmung der LD 50 nach LITCHFIELD und WILCOXON (46), eine kombiniert rechnerisch-zeichnerische Methode mit großer Meßgenauigkeit. Sie gestattet die Bestimmung einer Vertrauensgrenze und außerdem einen sehr exakten Vergleich zweier Kurven. Wir arbeiteten in jedem Fall mit 21 Kollektiven zu je 5 Mäusen. Wie aus den Tabellen 4 und 5 (Seite 25) ersichtlich, lagen unsere Virusverdünnungen zwischen 10^{-3} und 10^{-10} . Um möglichst viele Meßpunkte zu erhalten, legten wir von 10^{-4} bis 10^{-9} zwischen jede ganzlogarithmische Verdünnung noch je 3 Zwischenstufen (mit den Faktoren 2, 5; 5, 0; 7, 5). Jedes der Fünferkollektive wurde mit je einer Virusverdünnung infiziert. Nach 10 bis 12 Tagen wurde der Versuch als beendet angesehen.

b) Hämagglutinationstiter:

aa) Influenza: Wir gingen nach der von HIRST (23, s. auch 7, 8) beschriebenen Methode vor: Eine Virussuspension wird nach der Zweierlogarithmenreihe verdünnt. Zu jeder Verdünnungsstufe wird die gleiche Menge einer 0,5%igen Hühnererythrozytensuspension zugesetzt. Nach einer Stunde wird auf Hämagglutination geprüft. Als Endtiter bezeichnet man den Reziprokwert der Verdünnung, bei der gerade noch eine deutliche Agglutination festzustellen ist.

bb) EMC: Es wurde eine Methode zur hämagglutinatorischen Bestimmung von EMC-Viren angegeben (zit. HALLAUER (20)). Danach besitzen diese Viren die Fähigkeit, Hammelerythrozyten zu agglutinieren: Eine Virussuspension wird nach der Zweierlogarithmenreihe mit 0,45%iger Kochsalzlösung verdünnt. Jeder Verdünnungsstufe wird die gleiche Menge einer 0,5%igen Hammelerythrozytenaufschwemmung (in 4,5%iger Glukoselösung) zugesetzt. Nach Aufschütteln wird die Verdünnungsreihe zwei Stunden lang bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Nach dieser Zeit wird abgelesen.

Es gelang uns nicht, mit dieser Methode unseren Virusstamm nachzuweisen, weil durch längere Mäusepassagen die Hämagglutinationsfähigkeit der Viren verloren gehen soll (zit. (20)).

Für jede Bestimmung des Hämagglutinationstiters setzten wir 5 Verdünnungsreihen an, um möglichst genaue Werte zu erhalten. Die Virussuspension wur-

de einmal unverdünnt, dann 1:2, 1:3, 1:5 und 1:7 vorverdünnt verarbeitet. In der Tabelle erscheinen nur die Mittelwerte der Endtiter dieser einzelnen Verdünnungsreihen.

Nach KILBOURNE (32) ist die Differenz zweier Hämagglutinationstiter dann mit 95% Wahrscheinlichkeit signifikant, wenn der eine den andern um mindestens 50% übertrifft. Bei der Berechnung der Signifikanzen haben wir uns nach dieser Angabe gerichtet, weil eine Anwendung des STUDENTS Tests wegen der geringen Anzahl von Meßpunkten nicht gerechtfertigt erschien.

Versuchsanordnung und Ergebnisse

Tabelle 4: Bestimmung des Hämagglutinationstiters und des Infektionstiters bei Tieren mit Influenza-A-Infektionen unter Cortison.

Virus	Cortison mg/kg	N	mittlere Absterbe- geschw. $\pm \frac{S}{\bar{x}}$	P	L	LD ₅₀	Signifikanz nach (46)	mittl. Hämaggl. Titer	Signifikanz nach (32)
10 ⁻⁵	50 ∅	20	11,3 $\pm$ 0,53	>0,9	10			4200	+
		20	11,5 $\pm$ 0,65		10			6750	
10 ⁻⁶	12,5 ∅	50	8,0 $\pm$ 0,3	<0,05	10	1:9 · 10 ⁶	∅	240	?
		50	7,1 $\pm$ 0,32		10	1:2,9 · 10 ⁶		120	
10 ⁻⁶	12,5 ∅	30	12,1 $\pm$ 0,53	>0,2	30	1:1,4 · 10 ⁸	∅	225	∅
		30	11,3 $\pm$ 0,69		30	1:0,7 · 10 ⁸		245	

Tabelle 5: Bestimmung des Infektionstiters bei Tieren mit EMC-Infektionen.

Virus	Cortison mg/kg	N	mittlere Absterbe- geschw. $\pm \frac{S}{\bar{x}}$	P	G	LD ₅₀	Signif. nach (46)
10 ⁻⁷	12,5 ∅	15	8,5 $\pm$ 0,67	<0,001	5	1:3,5 · 10 ⁶	+
		15	3,7 $\pm$ 1,1		5	1:20 · 10 ⁶	

L = Anzahl der weiterverarbeiteten Lungen

G = Anzahl der weiterverarbeiteten Gehirne

a) Influenza : Gleichgroße Gruppen von Mäusen wurden mit abgestuften Virusverdünnungen infiziert. Die Hälfte der Gruppen wurde mit Cortison behandelt, die Kontrollgruppen erhielten 0,45%ige Kochsalzlösung. Nach Untersuchung der Absterbegeschwindigkeiten der einzelnen Kollektive wurde der Infektionstiter der Lungen bei den Cortisontieren und den Kontrollen bestimmt. Gleichzeitig erfolgte der hämagglutinatorische quantitative Nachweis der Viren in den Lungen. In den ersten beiden Versuchsansätzen verarbeiteten wir nur eine willkürlich herausgegriffene Anzahl von je 10 gestorbenen Tieren weiter, während im letzten Versuchsansatz alle 30 Tiere in jedem Kollektiv auf den Virusgehalt der Lungen untersucht wurden. Bei der gleichzeitig mit der Bestimmung des Infektionstiters angesetzten Bestimmung des Hämagglutinationstiters wurden dieselben Ausgangssuspensionen verwandt.

Ergebnis (s. Tabelle 4, Seite 25):

1. Es konnte in zwei Fällen keine signifikante Änderung des Infektionstiters (LD_{50}) durch Cortison festgestellt werden.
2. In einem Fall war der Hämagglutinationstiter in den Lungen der Cortisontiere signifikant erniedrigt, in zwei weiteren Versuchen war keine sichere Änderung des Hämagglutinationstiters zu verzeichnen.
3. Wir konnten keinen Zusammenhang zwischen der Änderung der mittleren Absterbegeschwindigkeit der Tierkollektive und dem Virus-Endgehalt ihrer Lungen erkennen.

b) EMC : Eine Gruppe von 15 Mäusen erhielt täglich 0,25 mg Cortison pro Tier, eine gleichstarke Kontrollgruppe erhielt täglich 0,2 ml 0,45%iger Kochsalzlösung pro Tier. Eine Stunde nach der ersten Injektion wurden beide Tierkollektive mit einer 10^{-7} -fach verdünnten Suspension vom EMC-Virus-haltigen Mäusegehirnen infiziert. Nach Kontrolle der Absterbeschwindigkeiten wurde in den Gehirnen der Versuchs- wie auch der Kontrolltiere der Infektionstiter bestimmt.

Ergebnis (s. Tabelle 5, Seite 25):

Obwohl die mittlere Absterbegeschwindigkeit der Tiergruppe, die Cortison erhalten hatte, signifikant erhöht war, war der in einem Mischgehirn von 5 Gehirnen bestimmte Infektionstiter gegenüber den Kontrollen signifikant erniedrigt.

Versuchsgruppe III

Nach den unterschiedlichen Ergebnissen unserer Tierversuche war es also notwendig geworden, die Versuchsanordnungen zu ändern, um genauere Untersuchungen des zeitlichen Ablaufs der Virusmultiplikation führen zu können. Wir schlossen deshalb unseren Versuchen an der weißen Maus mehrere Versuchsserien am bebrüteten Hühnerei an. Diese Methode bietet den Vorteil der jederzeit möglichen Unterbrechung der Virusmultiplikation und damit der genauen zeitlichen Analyse des Virusanstiegs. Ferner fällt beim bebrüteten Hühnerei der Einfluß unspezifischer Abwehrmechanismen weg, da der Hühnerembryo in den ersten Tagen der Bebrütung solche Mechanismen noch nicht besitzt (38).

MATERIAL UND METHODEN

Viren

Wir verwendeten in unseren ersten Ei-Versuchen ausschließlich einen eiadaptierten Influenza-A-Stamm PR 8, der im Hygiene-Institut Mainz seit längerer Zeit durch Serieneipassagen gehalten wird. In der letzten Versuchsgruppe verwendeten wir einen Influenza-B-Stamm LEE, der uns von den Behringwerken Marburg zur Verfügung gestellt wurde, jedoch auch vor der ersten Versuchsserie durch mehrere Eipassagen geführt wurde, um eine völlige Eiadaptation zu gewährleisten.

Virusinaktivierung

Nur in einem Versuch richteten wir uns nach der von KILBOURNE (33) angegebenen Methode, indem wir die frisch gewonnene Allantoisflüssigkeit 15 Stunden bei 37° C aufbewahrten, um eine Inaktivierung der Viren zu erreichen. Das Versuchsergebnis zeigte jedoch, daß die Inaktivierung sehr unvollkommen war beziehungsweise überhaupt nicht gelang. Daher gingen wir in den weiteren Versuchen nach der von ISAACS und LINDENMANN (26) beschriebenen Methode vor: 6 Teile frisch gewonnener virushaltiger Allantoisflüssigkeit wurden mit 2 Teilen einer 2%igen Lösung von Natriumcitrat in physiologischer Kochsalzlösung und 1 Teil Boratpuffer, PH 8,5 gemischt. Dieses Gemisch wurde eine Stunde lang auf 56° C erhitzt. Anschließend wurde der Hämagglutinationstiter bestimmt, der in allen Fällen wenig niedriger war als bei den Ausgangssuspensionen.

Bruteier

Alle unsere Versuche wurden am 10 Tage lang bebrüteten Hühnerei durchgeführt. Die Bruttemperatur lag stets zwischen 37 und 38° C.

Cortison

In unseren Versuchen am Breutei verwendeten wir ausschließlich eine wässrige Kristallsuspension von Cortisonacetat (Incortin "Merck", 25 mg/ml).

Injektionstechnik (s. auch (43))

a) Kontrolle auf Befruchtung: Am 3. Tage der Bebrütung werden die Eier in einem abgedunkelten Raum mittels einer elektrischen Lampe durchleuchtet. Man kann deutlich die Keimscheibe als roten Fleck mit zarter strahliger Gefäßzeichnung erkennen. Eier, die zu diesem Zeitpunkt nicht eine Keimscheibe erkennen lassen, werden als unbefruchtet ausgeschieden.

b) Bestimmung der Luftblase: Bei einer erneuten Durchleuchtung am 9. Tage wird der Rand der Luftblase auf der Schale markiert. Dies ist die Stelle, wo das Ei später zur Gewinnung der Allantoisflüssigkeit geöffnet wird.

c) Injektion in die Allantoishöhle: Beim Markieren der Luftblase wird an deren Unterrand eine größere Gefäßgabel markiert. Nach Abwischen der Eier mit Alkohol werden mit einer sterilen Nadel zwei Löcher in die Eischale gebohrt: Eines in das Dreieck zwischen Gefäßgabel und Luftblase (zur Injektion) und eines über der Luftblase selbst (zum Volumenausgleich). Die Injektion erfolgt durch waagrechtes Einführen einer sterilen Kanüle in ca. 0,5 cm Tiefe. Nach der Injektion werden beide Löcher durch erhitztes Paraffin verschlossen.

d) Injektion in den Dottersack: Sie erfolgt durch das Loch über der Luftblase: Eine sterile Kanüle wird ca. 4 bis 5 cm tief in Richtung auf die Eispitze vorgeschoben. Wir stellten durch Methylenblauinjektionen fest, daß die Injektionsflüssigkeit bei dieser Technik sicher in den Dottersack gelangt.

Entnahme der Allantoisflüssigkeit

Nach der gewünschten Bebrütungszeit wurden die Eier aus dem Brutschrank ent-

nommen. Die Embryonen wurden durch Kälte abgetötet, um eventuelle Blutaustritte aus bei der Entnahme durchtrennten Gefäßen (Änderung des Virusgehaltes der Allantoisflüssigkeit durch Hämagglutination) zu vermeiden. Wir konnten feststellen, daß die Embryonen nach 12 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$ oder nach 1/2 bis 1 Stunde bei -20°C sicher abgetötet waren.

Durch einen Zirkulärschnitt ein bis zwei Millimeter unterhalb des Unterrandes der Luftblase wurde nun das Ei geöffnet. Die Allantoisflüssigkeit konnte leicht steril mit der Pipette entnommen werden.

Hämagglutination

Hier hielten wir uns ebenfalls ausschließlich an die oben beschriebene Methode von HIRST (23, s. auch 7, 8), sowie an die Angabe von KILBOURNE (32), wonach die Differenz zweier mittlerer Hämagglutinationstiter dann mit einer Wahrscheinlichkeit von über 95% signifikant ist, wenn der eine den anderen um mehr als 50% übertrifft. Um möglichst viele Meßpunkte zu erhalten, arbeiteten wir mit vier Verdünnungen der einzelnen Virussuspensionen: 1:1; 1:3; 1:5; 1:7. Als Endtiter wurde der Reziprokwert der letzten Verdünnung angegeben, bei der noch eine deutliche Hämagglutination zu erkennen war. Wir bestimmten für jede Allantoisflüssigkeit den Mittelwert der Titer der einzelnen Verdünnungen und anschließend den Mittelwert der Einzeltiter jedes Kollektivs. Nur der letztere wurde tabellarisch festgehalten und statistisch ausgewertet.

Versuchsanordnungen und Ergebnisse

(s. Tabellen 6, 7, 8, Seite 30, 31 und 32)

1. Cortisongabe nach der Infektion: Drei Gruppen von je 16 Eiern wurden mit 0,3 ml einer 1:10 verdünnten PR8-Virussuspension (Allantoisflüssigkeit, Hämagglutinationstiter 5120 bis 10240) infiziert. 1/2 Stunde nach der Infektion erhielten zwei Gruppen eine einmalige Cortisongabe, und zwar erhielt Gruppe I 150 mg/kg und Gruppe II 15 mg/kg. Die dritte Gruppe erhielt zur gleichen Zeit 0,3 ml physiologischer Kochsalzlösung. Die Cortison- bzw. Kochsalzinjektionen erfolgten in den Dottersack, um eine sichere Resorption des fettlöslichen Cortisons zu gewährleisten.

Nach 24 und 48 Stunden wurde die Bebrütung unterbrochen und der Virusgehalt hämagglutinatorisch bestimmt.

Cortison		Virus 0,3 ml	Hämagglutinationstiter											
Dosis (mg/kg)	Zeit		3	6	9	12	14 ¹ / ₂	18	21	24	26	45	48	52
150 15 ø	1/2 Stunde vor	10 ⁻¹								2358 3234 2370			13440 25488 27980	
150 15 ø	24 Std. vor	10 ⁻¹								1414 1506 1500			12660 8760 7920	
150 ø	24 Std. vor	10 ⁻¹	ø	ø	60 52		1625 620				14360 2460			17400 2940
150 ø	24 Std. vor	10 ⁻³	ø	ø				380 230		780 390			2060 860	
150 ø	24 Std. vor	10 ⁻³	ø	ø	ø	ø				18880 31950				22350 9930

Tabelle 6

Tabelle 7:

Cortison		Virus 0,3 ml	Hämagglutinationstiter	
Dosis mg/kg	Zeit	10 ⁻³ aktiv	21	45
150 Ø	18 Std. vor		1720 2170	6240 7250
150 Ø	18 Std. vor	10 ⁻³ inaktiv	48 520	4900 8960

Erklärung der Tabellen 6 bis 8:

- Cortison = einmalige Injektion der angegebenen Gewichtsmenge in 0,3 ml Volumen zum angegebenen Zeitpunkt.
- Virus = Injektion von 0,3 ml der angegebenen Verdünnungen in die Allantoishöhle.
- Hämagglutinationstiter = Reziprokwert der Verdünnung, bei der gerade noch eine deutliche Hämagglutination feststellbar ist. In den Tabellen erscheinen nur die mittleren Hämagglutinationstiter (s. S. 29).

Tabelle 8:

Cortison 150 mg/kg	Virus I inaktiviert inter- ferierend	Virus II aktiv Challenge- Virus	Hämaggglutinationstiter	
			24 Std.	48 Std.
+ Ø	PR8 0,3 ml 10 ⁻¹	LEE 0,2 ml 10 ⁻²	Ø Ø	17900 8700
+ Ø	PR8 0,3 ml 10 ⁻¹	Ø	Ø Ø	Ø Ø
+ Ø	Ø	LEE 0,2 ml 10 ⁻²	Ø Ø	17900 8700
+ Ø	PR8 0,3 ml 10 ⁻¹	LEE 0,2 ml 10 ⁻²	Ø Ø	13600 14000
+ Ø	PR8 0,3 ml 10 ⁻¹	Ø	Ø Ø	20480 20480
+ Ø	Ø	LEE 0,2 ml 10 ⁻²	Ø Ø	12300 5300
+ Ø	PR8 0,3 ml 10 ⁻¹	LEE 0,2 ml 10 ⁻²	Ø Ø	17900 8700
+ Ø	PR8 0,3 ml 10 ⁻¹	Ø	Ø Ø	Ø Ø
+ Ø	Ø	LEE 0,2 ml 10 ⁻²	Ø Ø	17900 8700
+ Ø	LEE 0,3 ml 10 ⁰	PR8 0,2 ml 10 ⁻⁴	Ø Ø	12800 6600
+ Ø	LEE 0,3 ml 10 ⁰	Ø	Ø Ø	Ø Ø
+ Ø	Ø	PR8 0,2 ml 10 ⁻⁴	Ø Ø	12800 6400

Ergebnis: Während nach 24 Stunden Bebrütungszeit keine Unterschiede im Hämagglutinationstiter der einzelnen Gruppen zu bemerken waren, lag nach 48 Stunden der Hämagglutinationstiter der Gruppe mit hoher Cortisondosierung um mehr als 100% unter dem der Kontrollen, während die Gruppe mit niedriger Cortisondosierung keine Verschiebung des Hämagglutinationstiters gegenüber den Kontrollen zeigte.

2. Cortisongabe vor der Infektion: Zwei Gruppen von je 16 Eiern erhielten eine einmalige Cortisongabe in Höhe von 150 mg/kg bzw. 15 mg/kg. Eine dritte gleichgroße Gruppe erhielt als Kontrolle eine Injektion von 0,3 ml physiologischer Kochsalzlösung. 24 Stunden später wurden alle Eier mit je 0,3 ml einer 1:10 verdünnten PR8-Virus suspension (Allantoisflüssigkeit, Hämagglutinationstiter 5120) infiziert.

24 Stunden und 48 Stunden nach der Infektion wurde bei der Hälfte jedes Kollektivs der Hämagglutinationstiter bestimmt.

Ergebnis: Nach 24 Stunden waren keine Unterschiede im mittleren Hämagglutinationstiter der einzelnen Kollektive zu bemerken. Jedoch lag nach 48 Stunden Bebrütungszeit der Hämagglutinationstiter der Gruppe mit hoher Cortisondosierung signifikant über dem der Kontrollen, während der der Gruppe mit niedriger Cortisondosierung nicht sicher verschoben war.

3. Zeitlicher Ablauf der Virusmultiplikation:

a) Hohe Virusdosierung: Eine Gruppe von 48 Eiern erhielt eine einmalige Cortisoninjektion (150 mg/kg). Eine gleichgroße Kontrollgruppe erhielt 0,3 ml Kochsalzlösung. 24 Stunden später wurden alle Eier mit 0,3 ml einer 1:10 verdünnten PR8-Virus suspension (Allantoisflüssigkeit, Hämagglutinationstiter 5120) infiziert. Nach 3, 6, 9, 14^{1/2}, 26 und 52 Stunden wurde je ein Kollektiv von 8 Eiern auf seinen Gehalt an hämagglutinierenden Einheiten untersucht.

Ergebnis: Nach 3 und 6 Stunden Bebrütungszeit war weder in den Eiern, die Cortison erhalten hatten, noch in den Kontrollkollektiven Virus hämagglutinatorisch nachweisbar. Nach 9, 14^{1/2}, 26 und 52 Stunden übertraf der Hämagglutinationstiter der Cortisongruppe signifikant den der Kontrollen.

b) Niedrige Virusdosierung: Gleichgroße Gruppen von Eiern wurden mit einer 1:1000 verdünnten PR8-Virus suspension infiziert. Eine Gruppe erhielt 24 Stunden vor der Infektion eine einmalige Cortisongabe von 150 mg/kg,

die andere erhielt zur Kontrolle 0,3 ml Kochsalzlösung. Auch in diesen Versuchen wurde die Bebrütung in verschiedenen Zeitabständen unterbrochen, und die Kollektive auf ihren Gehalt an hämagglutinierenden Einheiten untersucht.

Ergebnis: Nach 3, 6, 9 und 12 Stunden war in allen Kollektiven Virus hämagglutinatorisch nicht nachweisbar. In einem Versuch lag nach 18, 24 und 48 Stunden der Gehalt der Cortisongruppe an hämagglutinierenden Einheiten signifikant über dem der Kontrollen. In einem zweiten Versuch war nach 24 Stunden der Hämagglutiningehalt der Kontrollen gegenüber dem der Cortisongruppen signifikant erhöht, während nach 48 Stunden der Gehalt der Cortisongruppe an hämagglutinierenden Einheiten den der Kontrollen um mehr als 100% und damit signifikant übertraf.

4. Verhalten von "aktivem" und "inaktiviertem" Virus: Ehe wird uns der nächsten Versuchsserie zuwandten, nämlich den Interferenzversuchen, wollten wir in einem Vorversuch das Verhalten von inaktiviertem Virus unter Cortison untersuchen.

Die Hälfte einer PR8-Virussuspension wurde 15 Stunden lang im Brutschrank auf 37° C erwärmt, um eine Inaktivierung der Viren zu erreichen (31). Der Rest der Virussuspension wurde bei +4° C aufbewahrt. Nach dieser Zeit hatten beide Virussuspensionen einen Hämagglutinationstiter von 5120. Nunmehr wurden gleichgroße Gruppen von Bruteiern, von denen je die Hälfte eine einmalige Cortisongabe von 150 mg/kg erhalten hatten, nach folgendem Schema infiziert:

	Gruppe I		Gruppe II	
Virus	aktiv		inaktiviert	
Infektionsdosis	0,3 ml 10 ⁻³		0,3 ml 10 ⁻³	
Cortison	+	∅	+	∅
Bebrütungszeit in Std.	21/45	21/45	21/45	21/45

Nach 21 und 45 Stunden wurden die Allatoisflüssigkeiten entnommen und der mittlere Hämagglutinationstiter der einzelnen Kollektive bestimmt.

Ergebnis: Zunächst mußten wir feststellen, daß die PR8-Virussuspension nach 15 Stunden Erwärmung auf 37° C keineswegs völlig inaktiviert worden war, denn es zeigte sich, auch in den Kollektiven, die kein Cortison erhalten hatten, ein starker Titeranstieg nach 45 Stunden. Der Hämagglutinationstiter der Kontrollen lag in allen Fällen über dem der Cortisonkollektive. Allerdings war eine Signifikanz nur bei den Kollektiven, die mit der thermisch vorbehandelten Virussuspension infiziert worden waren, zu erkennen. Hier lag der 21-Stunden-Wert der Kontrollen 10,8 mal und der 45-Stunden-Wert 1,83 mal höher als der der Cortisonkollektive.

5. Interferenzversuche: Als Interferenz bezeichnet man in der Virologie ein Phänomen, bei dem die Vermehrung eines Virus durch ein anderes inhibiert wird. Das Virus, das die Interferenz verursacht, wird als "interferierendes", dasjenige, dessen Vermehrung gehemmt wird, in der englischsprachigen Literatur als "Challenge"-Virus bezeichnet. Ist das interferierende mit dem Challenge-Virus identisch oder serologisch verwandt, so spricht man von homologer, im anderen Falle von heterologer Interferenz. Das Phänomen läßt sich nicht nur durch intaktes Virus auslösen, sondern auch durch solches, dessen infektiöses Prinzip inaktiviert wurde (zit. 52).

KILBOURNE und Mitarbeiter (36) stellten fest, daß die von ihnen beobachteten gesteigerten Virusausbeuten bei Virusinfektionen unter Cortisonbehandlung letztlich die Folge der durch Cortison gehemmten Interferenz seien (s.o.). Zur Nachprüfung dieses Befundes mit unseren Stämmen setzten wir vier Versuchsgruppen an. Als interferierendes Virus (52) wurde in drei Fällen ein nach ISAACS und Mitarbeitern (26) inaktivierter PR8-Stamm verwandt, im vierten Versuch dagegen ein auf die gleiche Art inaktivierter LEE-Stamm. Als Challenge-Virus (52) nahmen wir in den ersten drei Versuchen den LEE-Stamm und im letzten Versuch den PR8-Stamm. Es handelte sich also in unserer Versuchsreihe ausschließlich um heterologe Interferenz mit inaktiviertem interferierendem Virus.

Versuchsanordnung: Kollektive von 8 bis 20 Bruteiern erhielten eine einmalige Cortisongabe von 150 mg/kg. Gleichgroße Kontrollkollektive erhielten zur gleichen Zeit 0,3 ml physiologischer Kochsalzlösung. 24 Stunden später injizierten wir einem Teil der Bruteier eine große Dosis des inaktivierten interferierenden Virus. 3 Stunden nach der Injektion des interferierenden Virus wurde ein Teil der Eier mit einer kleinen Dosis des aktiven Challenge-Virus infiziert. Es entstand also folgende Anordnung (s. Tabelle 8): Je ein

Cortison- und Kontrollkollektiv erhielt beide Virusarten, je eines nur das interferierende Virus und je eines nur das Challenge-Virus.

Nach 24 und 48 Stunden Bebrütungszeit wurden die Hämagglutinationstiter aller Kollektive bestimmt.

Ergebnis: Wir konnten in keinem Falle eine Hemmung des Challenge-Virus durch das interferierende Virus beobachten. Während in drei Versuchen das interferierende Virus so weit inaktiviert war, daß es sich nicht vermehrte, zeigte sich in einem vierten Versuch, daß trotz der Wärmebehandlung eine starke Virusvermehrung stattfand.

In allen Versuchen war der Hämagglutinationstiter der Cortisongruppen gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht.

DISKUSSION

In einer Reihe von Untersuchungen haben wir uns mit der Frage der hormonalen Beeinflussung von Virusinfektionen beschäftigt. Wir stimmen mit der Ansicht von MELNOTTE und Mitarbeitern (48) insofern überein, als auch wir glauben, daß unter den Hormonen allein das Cortison eingehendere Untersuchungen rechtfertigt. Wir hatten jedoch auch den Eindruck, daß sich hinsichtlich der hormonalen Beeinflußbarkeit und dem damit erzielten Effekt sowohl beim Infektionsobjekt (Tier - Brutei) als auch beim infektiösen Agens selbst (pneumotrope und neurotrope Viren in verschiedenen Stammvarianten und Adaptionsphasen) außerordentlich starke Differenzen zeigen. Wegen der Fülle der sich damit ergebenden Möglichkeiten war es darum von vornherein notwendig, den Gesamtstoff erheblich einzuschränken und nur die wesentlichen Punkte klar herauszustellen. Schon der Applikationsort des Hormons mußte genau festgelegt werden. Zwar spielte beim Tier die Injektionsstelle keine entscheidende Rolle, da die Resorption praktisch von jedem Ort aus gewährleistet ist, jedoch waren beim Brutei nur solche Applikationsorte erfolgversprechend (um einen Wirkungseintritt zu erzielen), von denen aus eine sichere und schnelle Resorption des Hormons zu erwarten war. In Vorversuchen (59), die in der vorliegenden Arbeit nicht aufgeführt wurden, konnte festgestellt werden, daß zum Beispiel die Injektion des Cortisons in die Allantoishöhle des Bruteies - vermutlich wegen mangelnder Resorption - zu keinem meßbaren Ergebnis im Hinblick auf die Virussynthese führt.

Selbst Variationen in bezug auf Hormondosis und Applikationszeitpunkt konnten wir nur in einzelnen Versuchen durchführen.

Aus dem Gesagten geht hervor, daß wir von vornherein auf bestimmte - unter Umständen biologisch bedeutsame - Versuchsvariationen verzichten und die Methodik darauf abstimmen mußten, daß das Grundlegende zutage kam. Wir wählten deshalb 1. verschiedene Infektionsobjekte (Maus und Brutei) und 2. verschiedene infektiöse Agentien (1. je einen mäuse- und einen eiadaptierten Influenza-A-Stamm PR8, 2. einen eiadaptierten Influenza-B-Stamm LEE und 3. einen mäuseadaptierten EMC-Stamm).

Obwohl sich beim ersten Überblick über unsere Experimente gewisse, allen Versuchsanordnungen gemeinsame Befunde anzudeuten schienen, war jedoch aus jeder einzelnen Versuchsserie ein nur für diesen speziellen Fall gültiges Er-

gebnis zu ersehen. Dieses Resultat ist im Grunde genommen nicht überraschend, da ja das untersuchte Geschehen einen Komplex von mindestens fünf sich gegenseitig beeinflussenden und/oder bedingenden Vorgängen darstellt, nämlich:

1. den auf die Virussynthese abgestimmten Zellstoffwechsel,
2. die Beeinflussung dieses Zellstoffwechsels durch das Hormon,
3. die Beeinflussung des Haft- und Ausbreitungsvermögens der Viren im Organismus durch das Hormon,
4. die Reaktion des Organismus auf die Virusinfektion,
5. die Beeinflussung dieser Reaktion durch das Hormon.

Nimmt man als Kriterium zu Punkt 1 die Menge der nachweisbaren infektiösen resp. hämagglutinierenden Einheiten, so läßt sich für unsere Untersuchungen folgendes sagen:

Statistisch signifikant, insbesondere beim Tier mit EMC-Infektion, ist unter der künstlichen Cortisonzufuhr eine Verminderung der infektiösen Einheiten pro Gewichtseinheit infizierten Gewebes (Gehirn) feststellbar. Bei der Influenza-A-Infektion der Maus war dieser Befund nicht konstant zu erheben. Vielmehr zeigte sich unter der von uns gewählten Cortisondosierung, d.h. der täglichen intramuskulären Verabreichung von 12,5 bzw. 50 mg/kg, nur in einer Versuchsserie eine jenseits der Zufallsbedingtheit liegende Verminderung des Virusgehalts des befallenen Organs (Lunge), während bei den beiden anderen Versuchsserien keine sicheren Änderungen zu verzeichnen waren. Die quantitative Bestimmung der Virusmenge geschah im Falle der EMC-Infektion lediglich mit Hilfe der Bestimmung der LD₅₀ (46). Bei der Influenza-Infektion bestimmten wir den Virusgehalt der Lungen ebenfalls anhand der LD₅₀, darüber hinaus ermittelten wir bei dieser Infektion den Hämagglutinationstiter des Gewebepreßsaftes.

Auffallend war, daß trotz erniedrigter nachweisbarer Virusmenge im Tier bei mittlerer und niedriger Virusdosierung eindeutig eine Verschiebung der zeitlichen Absterbeordnung eintrat, und zwar in Form einer deutlichen Erhöhung der mittleren Absterbegeschwindigkeiten unter Cortison. Eine Erklärung für dieses Phänomen können wir nicht geben. Es besteht unseres Erachtens kein Anlaß zu der von POETSCHKE (50) erwähnten Vermutung, es könne unter Cortison eine Virulenzänderung der Viren eintreten. Vielmehr möchten wir annehmen, daß es sich um eine allgemeine Verminderung der Abwehrkräfte des befallenen Organismus handelt. Das Aufflackern latenter Virusinfekte kann nicht sicher ausgeschlossen werden, obwohl wir die am häufigsten be-

schriebene latente Virusinfektion, die Ektromelie, in regelmäßig durchgeführten mikroskopischen Untersuchungen von Lungentupfpräparaten nie nachweisen konnten. Es bleibt also - im Gegensatz zum bakteriellen Infekt - der Befund einer Verminderung des infektiösen Agens im unter Cortison stehenden Tier. Und es ist sicher, daß die verminderte Virusmenge ausreichte, den letalen Ausgang der Infektion herbeizuführen.

Um diese Frage an einem einfacheren und übersichtlicheren Objekt zu untersuchen, führten wir Versuchsreihen am Brutei durch. Hier kamen wir überraschend zu anderen Ergebnissen. Zwar war die Virusmenge bei Cortisongaben nach der Infektion (mit Influenza-A-Stamm PR8) ebenfalls erniedrigt, jedoch zeigten Bruteier, die - wie unsere Versuchstiere - schon vor der Infektion Cortison erhalten hatten, eine erhöhte Virusproduktion, gemessen am mittleren Hämagglutinationstiter der Allantoisflüssigkeiten. Außerdem ergab sich eine deutliche Stammabhängigkeit der Cortisonwirkung, indem der Influenza-B-Stamm LEE bezüglich seiner Multiplikation deutlich mehr beeinflusst wurde als der Influenza-A-Stamm PR8.

Die Befunde am Brutei entsprechen also nicht unseren Beobachtungen am Tier, insbesondere, was die Menge der produzierten Viren anbelangt. Wie schon erwähnt, konnte regelmäßig eine signifikante Erhöhung des mittleren Hämagglutinationstiters beim unter Cortison stehenden Brutei im Vergleich zum gewöhnlichen infizierten Brutei gefunden werden. Es ist nicht ausgeschlossen, daß die Erniedrigung der Virusmenge im Tierversuch durch eine zu frühe Unterbrechung der Virussynthese infolge des verfrühten Todeseintritts hervorgerufen wird. Andererseits steht dieser Befund im Einklang mit der von uns in Parallelversuchen (59) in Übereinstimmung mit anderen Autoren (13, 28) getroffenen Beobachtung, daß die Proteinsynthese im Organismus unter Cortison erheblich reduziert wird. Um so erstaunlicher sind die Beobachtungen am Brutei. Da der Befund der Erhöhung der Virusproduktion nur dadurch erklärbar erscheint, daß die Zahl der befallenen Zellen erhöht ist - eine Erhöhung der Zellstoffwechselleistung ist ausgeschlossen - mußten wir unser Augenmerk besonders auf den zeitlichen Verlauf der Virussynthese (und auf die an ihn gekoppelte Interferenz) richten. Hierbei konnten wir die von KILBOURNE (35, 36, 37) beobachtete initiale Hemmung der Virussynthese unter Cortison mit den uns zur Verfügung stehenden Stämmen nicht bestätigen, hingegen fanden wir genau wie KILBOURNE einen erhöhten Virus-Endgehalt der Allantoisflüssigkeiten, gemessen am Hämagglutinationstiter. Weiterhin durchgeführte Interferenzversuche scheiterten daran, daß uns eine abgestufte Inak-

tivierung unserer Virusstämmen nicht gelang, d.h. wir konnten unsere Virusstämmen nach der von ISAACS und Mitarbeitern (26, 27, 45) angegebenen Methode zwar soweit inaktivieren, daß sie nicht mehr an der Multiplikation teilnahmen, jedoch gingen bei diesem Prozeß auch ihre Interferenzaktivitäten verloren. Es ist daraus zu schließen, daß die von den erwähnten Autoren erhobenen Befunde offensichtlich stammgebunden sind. Lediglich die regelmäßig zu beobachtende starke Erhöhung der Virusmenge im Brutei, und zwar in der zweiten Phase des Infektionsverlaufes, scheint allen Stämmen gemeinsam zu sein. Eine Erklärung für diesen Befund ist bisher nicht zu geben; auf Grund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse kann aber geschlossen werden, daß die Klärung des Befundes im Rahmen des Interferenzphänomens zu suchen ist.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde in Versuchsreihen an der weißen Maus und am Brutei der Einfluß von Cortison und Prednison auf die Multiplikation von Viren (Influenza-A-Stamm PR8, Influenza-B-Stamm LEE und EMC-Stamm) untersucht. Die Tierversuche ergaben eine bei mittlerer und niedriger Virusdosierung konstante Verschiebung der zeitlichen Absterbeordnung im Sinne einer signifikant erhöhten mittleren Absterbegeschwindigkeit der unter Cortison stehenden Tiere. Der Virusgehalt pro Gewichtseinheit infizierten Gewebes (Gehirn), gemessen an der LD 50, war jedoch bei der EMC-Infektion der Maus unter Cortison signifikant erniedrigt; für die Influenza-A-Infektion der Maus ließ sich dieser Befund allerdings nur teilweise bestätigen.

Im Gegensatz zu den Befunden der Tierversuche standen die Ergebnisse der Experimente am Brutei. Bei Cortisonzufuhr nach der Infektion war zwar auch die Virus-Endausbeute (gemessen am mittleren Hämagglutinationstiter der Allantoisflüssigkeiten) vermindert, sie war jedoch bei vor der Infektion liegender Cortisonapplikation regelmäßig und signifikant erhöht, insbesondere bei der Infektion mit dem Influenza-B-Stamm LEE.

Die Möglichkeiten einer Erklärung dieser Befunde werden diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Albrecht, J.: Vergleichende Desinfektionsmittelprüfung an verschiedenen Virusarten.
Arch. Hyg. 141, 460-468 (1957).
2. Aronson, St. M. und Shwartzman, G.: Histopathogenesis of Cortisone-Altered Experimental Poliomyelitis. Observations on the Syrian Hamster Inoculated Intracerebrally with Strain MEF1.
Am. J. Path. 29, 383-395 (1953).
3. Ballowitz, L.: Leucozytenfunktionen beim gesunden und kranken Kind. I. Mitteilung: Methoden zur Funktionsprüfung der Leucozyten.
Zbl. Bakt. I. Orig. 167, 529-548 (1957).
4. " Leucozytenfunktionen ...
II. Mitteilung: Einfluß verschiedener Bakterienarten und antibiotischer Mittel auf die Lebensäußerungen der Leucozyten in vivo.
Zbl. Bakt. I. Orig. 167, 548-561 (1957).
5. " Leucozytenfunktionen ...
III. Mitteilung: Verhalten der Leucozytenfunktionen beim Menschen.
Zbl. Bakt. I. Orig. 168, 95-140 (1957).
6. Bieling, R.: Die Pathogenese der Viruserkrankheiten.
Zbl. Bakt. I. Orig. 160, 1/5, 131-139 (1953).
7. Blumenthal, H. T., Greiff, D., Pinkerton, H., Dewitt, R.: Influenza. 1. The Hemagglutination and Infectivity Titre Curves of PR8 Influenza Virus Cultivated in Embryonated Eggs at Different Temperatures.
J. exp. Med. 91, 321-329 (1950).
8. Burnet, F. M.: Hemagglutination in Relation to Hostcell-Virus Interaction.
Am. Rev. Microbiol. 6, 229-246 (1952).
9. Caspersson, T., Thorson, K. G.: Virus und Zellstoffwechsel.
Klin. Wschr. 31, 205-212 (1953).

10. Dubos, R.J. : Effects of Ketone Bodies and other Metabolites
on the Survival and Multiplication of Staphylo-
cocci and Tubercle Bacilli.
J. exp. Med. 98, 145-155 (1953).
11. " Biochemical Determinants of Microbial Dis-
eases.
Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass. (1954).
12. " Biochemical Determinants of Infection.
Bull. N. Y. Acad. Med. 31, 5-19 (1955).
13. Evans, H.J. : Action of Cortisone on Developing Chick
Embryo.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 83, 31-34 (1953).
14. Fong, J., Louie, R. : Interference in Cortisone-Treated Hosts.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 84, 269-271 (1953).
15. Geigy, J.R. : Wissenschaftliche Tabellen.
Basel 1955.
16. Geks, F. : Häufigkeitsanalyse der Überlebenszeiten expe-
rimentell infizierter Mäuse.
Z. Naturf. 7 b, 313-320 (1952).
17. " Die Absterbeordnung experimentell infizierter
Tiere in Versuchen mit niedriger Infektionsdosis.
Z. Naturf. 7 b, 671-675 (1952).
18. " Über die Inkubationszeit experimentell infizier-
ter Tiere.
Zbl. Bakt. I. Orig. 158, 323-326 (1952).
19. Gönnert, R. : Über Virusmorphologie und Virusvermehrung.
Behringwerk-Mitteilungen 25, 61-91 (1952).
20. Hallauer : Handbuch der Virusforschung.
3. Ergänzungsband (1958).
21. Henle, G.,
 Henle, W. : Interference between Inactive and Active
Viruses of Influenza.
IV. The Nature of the Interfering Agent.
Am. J. Med. Sciences 210, 369-374 (1945).

22. Henle, W.,
Henle, G.,
Kirber, M. W.: Interference between Inactive and Active
Viruses of Influenza.
V. Effect of Irradiated Virus on the Host Cells.
Am. J. Med. Sciences 214, 529-541 (1947).
23. Hirst, G. K.: The Agglutination of Red Cells by Allantoic
Fluid of Chick Embryo Infected with Influenza
Virus.
Science 94, 22-23 (1941).
24. Horsfall, F. L. jr.,
Tamm, I.: Fractional Dilution Procedure for Precise Titr-
ation of Hemagglutinating Viruses and Hemag-
glutination-inhibiting Antibodies.
J. Immunol. 70, 253-259 (1953).
25. Horsfall, F. L. jr.: On the Reproduction of Influenza Virus. Quan-
titative Studies with Procedures which Enumer-
ate Infective and Hemagglutinating Virus Part-
icles.
J. exp. Med. 100, 135-161 (1954).
26. Isaacs, A.,
Lindenmann, J.: Virus interference. I. The Interferon.
Proc. Royal Soc. B. 147, 258-267 (1957).
27. Isaacs, A.,
Lindenmann, J.,
Valentine, R. C.: Virus interference. II. Some Properties of
Interferon.
Proc. Royal Soc. B. 147, 268-273 (1957).
28. Karnofsky, D. A.,
Ridgway, L. P.,
Patterson, P. A.: Growth-inhibiting Effect of Cortisone Acetate
on the Chick Embryo.
Endocrinol. 48, 696 (1951).
29. Kass, E. H.,
Neva, F. A.,
Finland, M.: Failure of ACTH to Protect against Acutely
Lethal Toxins of Influenza Virus and Rickettsiae.
Proc. Soc. exp. Med. Biol. 76, 560-563 (1951).
30. Kilbourne, E. D.: Paradoxical Effects of Cortisone on Influenza-B-
Virus-Infection of the Chick Embryo.
J. Clin. Invest. 31/I. 643 (1952).
31. " Reactivation of Non-Infective Virus in a Corti-
sone-Treated Host.
J. exp. Med. 101, 437-450 (1955).

32. Kilbourne, E. D.: The Influence of Cortisone on Experimental Viral Infection. I. Prolongation of Survival Time and Suppression of Inflammation in Chick Embryos Infected with Influenza B Virus. *J. Immunol.* 74, 57-62 (1955).
33. " Influence of Cortisone on Experimental Viral Infection. II. Effects on Antibody Formation and Acquired Immunity. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 90, 685-687 (1955).
34. " Cortisone modification of the dynamics of influenza virus increase. *Fed. Proc.* 15, 597 (1956).
35. " Influence of Cortisone on Experimental Viral Infection. III. Effects on Certain Dynamics of Influenza Virus Increase. *J. exp. Med.* 106, 851-862 (1957).
36. " The Influence of Cortisone on Experimental Viral Infection. IV. Negation of Interference as the Mechanism by which Cortisone Induces Increased Virus Yields. *J. exp. Med.* 106, 863-881 (1957).
37. " The Influence of Cortisone on Experimental Viral Infection. V. Inhibition of Influenza Virus Synthesis. *J. exp. Med.* 106, 883-892 (1957).
38. Kilbourne, E. D.,
Horsfall, F. L. jr.: Increased Virus in Eggs Injected with Cortisone. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 76, 116-118 (1951).
39. Kilbourne, E. D.,
Tateno, I.: In Vitro Effects of Cortisone on Multiplication of Influenza B Virus. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 82, 274-277 (1953).
40. Kilbourne, E. D.,
Daves, L. M.: Influence of cortisone on adaptation of influenza A virus to mouse lung. *Fed. Proc.* 12, 449-450 (1953).
41. Kliewe, H.,
Fischer, H.: Zur Wirkung der Kastration auf die Infektionsfähigkeit und Antikörperbildung beim Tier. *Zbl. Bakt. I. Orig.* 100, 4-6, 161-168 (1928).

42. Kliewe, H.,
Wasielewski, E. V.: Begriff und Wesen der Pathogenität, Infektio-
sität und Virulenz von Bakterien.
Ärztl. Forsch. 11, 1/165-I/179 (1957).
43. Köhler, H. R.: Über die Pathogenese der Influenzainfektion
des Hühnerembryos nach Virusinjektion in die
Allantoishöhle.
Zbl. Bakt. I. Orig. 163, 92-117 (1955).
44. Kradolfer, F.,
Schär, B.: Virushemmung und Zellwirkung.
Arch. ges. Virusf. 7, 297-306 (1957).
45. Lindenmann, J.,
Isaacs, A.: Versuche über Virusinterferenz.
Schweiz. Zschr. allg. Path. Bakt. 20, 640-646
(1957).
46. Litchfield, J. T.: A Simplified Method of Evaluating Dose-Effect
Wilcoxon, F.: Experiments.
J. Pharmacol. exp. Therap. 96/2, 99-113 (1949).
47. Marcus, S.,
Esplin, E. W.,
Hill, G. A.: Effects of Cortisone, Ascorbic Acid and Piromen
on Phagozytosis in Mice.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 84, 565-568 (1953).
48. Melnotte, P.,
Herbeuval, R.,
Derby, G.: L'influence du terrain endocrinien sur les in-
fections.
Biol. Médicale 47, 418-561 (1958).
49. Nauck, E. G.: Die Pathologie der Viruskrankheiten.
Zbl. Bakt. I. Orig. 160, 1/5, 139-146 (1953).
50. Poetschke, G.: Zur Theorie provozierender Faktoren bei der
Poliomyelitis.
Klin. Wschr. 34, 284-291 (1956).
51. Prigge, R.: Experimentelle Untersuchungen zur Chemo-
therapie der Tuberkulose.
Klin. Wschr. 20, 633-638 (1941).
52. Schäfer, W.: Interferenz und Interferon.
Dtsch. med. Wschr. 41, 1825-1826 (1958).
53. Selye, H.: Stress.
I. Bd., Edit. med. Acta inc., Montreal, Canada
(1950).

54. Schwartzman, G.: Enhancing Effect of Cortisone upon Poliomyelitis Infection (Strain MEF 1) in Hamsters and Mice.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 75, 835-838 (1950).
55. Schwartzman, G.,
Fisher, A.: Alteration of Experimental Poliomyelitis Infection in the Syrian Hamster with the Aid of Cortisone.
J. exp. Med. 95, 347-362 (1952).
56. Sprunt, D.H.,
McDearman, S.: Studies on the Relationship of Sexhormones to Infection. III. A quantitative study of the increased resistance to vaccinia infection by the estrogenic hormone and pseudopregnancy.
J. Immunol. 38, 81-95 (1940).
57. Teodoru, C.V.: Influence of Cortisone and Stress upon Persistence and Multiplication of MEF 1 Virus in Hamsters.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 95, 674-677 (1957).
58. Teodoru, C.,
Schwartzman, G.: Relation of Certain Endocrine Disturbances to Susceptibility of Golden Syrian Hamster to Experimental Poliomyelitis.
J. exp. Med. 100, 563-574 (1955).
59. Wasielewski, E.v.: mündliche Mitteilung.
60. Wasielewski, E.v.,
Knick, B.: Experimenteller Beitrag zur Cortisonwirkung am Tier nach Inoculation pathogener und apathogener Mikroorganismen.
Zschr. exp. Med. 129, 548-558 (1958).

Ich danke Herrn Professor Dr. K l i e w e für die Gewährung des Arbeitsplatzes in seinem Institut sowie für die Übernahme des Korreferates.

Gleichzeitig danke ich Herrn Dozent Dr. v o n W a s i e l e w s k i für die Überlassung des Themas und für seine stete Hilfsbereitschaft bei allen Schwierigkeiten, die sich im Laufe der Arbeit ergeben haben.

Fräulein Marie Luise S c h u s t e r danke ich für die technische Assistenz bei der Durchführung der Versuche.

LEBENS LAUF

Ich, Reiner Peter Wolfgang Bünnagel, wurde am 7. Juni 1930 als Sohn des praktischen Arztes Dr. Ernst Michael Bünnagel und seiner Ehefrau Elisabeth, geborene Mauss, in Frankfurt am Main geboren.

Von Ostern 1936 bis Ostern 1939 besuchte ich die Volksschule in Flonheim, Kreis Alzey. Von Ostern 1939 bis September 1939 war ich Schüler der Zinzendorf-Oberschule in Königsfeld im Schwarzwald, um dann wegen Ausbruch des Krieges an die Oberschule für Jungen in Alzey überzuwechseln. Dort legte ich am 21. Juli 1948 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1948 begann ich das Studium der Medizin an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, wo ich am 5. Mai 1951 das Physikum bestand. Nach zweisemestrigem Studium in Gießen (von Wintersemester 1952/53 bis Sommersemester 1953) kehrte ich nach Mainz zurück und legte am 27. Mai 1954 das Staatsexamen ab.

Nach kurzer Tätigkeit als Praxisvertreter (Landvierteljahr) absolvierte ich meine Pflichtassistentenzeit an der Universitäts-Kinderklinik in Mainz. Vom 1. Januar 1956 bis 31. Dezember 1956 war ich Assistenzarzt am Städtischen Krankenhaus in Meisenheim am Glan. Im Jahre 1957 vertrat ich meinen Vater, da er wegen eines Unfalles nicht in der Lage war, seine Landpraxis selbst zu versorgen.

GESAMTHERSTELLUNG:
DITTERS BÜRODIENST, MAINZ, Augustinerstraße 64-66



